

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jorge Raul PASQUALINI

1^{re} THÈSE :

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES
CORTICOSTÉROÏDES.

2^e THÈSE :

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 15-3-62 devant la Commission d'examen

*Ouvrage publié avec le concours
du Centre National de la Recherche Scientifique*

M. JOST	Président
M. LEDERER	} Examineurs
M. JULIA M.	

IMPRIMERIE
R. FOULON & C^{ie}
29, RUE DEPARCIEUX, 29
PARIS — 1962

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jorge Raul PASQUALINI

1^{re} THÈSE :

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES
CORTICOSTÉROÏDES.

2^e THÈSE :

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le devant la Commission d'examen

*Ouvrage publié avec le concours
du Centre National de la Recherche Scientifique*

M. JOST	Président
M. LEDERER	} Examinateurs
M. JULIA M.	

IMPRIMERIE
R. FOULON & C^{ie}
29, RUE DEPARCIEUX, 29
PARIS — 1962

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen M. ZAMANSKY

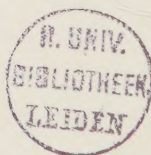
PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure	EICHHORN	T	Botanique
DE BROGLIE ...	T	Théories physiques	DE CUGNAC ...	T	Biologie végétale (S.P.C.N.)
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées	Mlle CAUCHOIS .	T	Chimie physique
PÈRES	T	Mécanique des fluides et applications	THEILLIER	T	Physique du Globe
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés	L'HÉRITIER	T	Biologie générale (Orsay)
PRÉVOST	T	Chimie organique	GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay)
CHAUDRON	T	Chimie appliquée	PONCIN	T	Mécanique générale
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie	DUBREIL	T	Arithmétique et Théorie des nombres
TEISSIER	T	Zoologie	QUELET	T	Chimie organique
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay)	CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
AUGER	T	Physique quantique et Relativité	CHAMPETIER ...	T	Chimie macromoléculaire
MONNIER	T	Physiologie générale	CUVILLIER	T	Micropaléontologie
PIVETEAU	T	Paléontologie	JUNG	T	Pétrographie
ROCARD	T	Physique (E.N.S.)	TRILLAT	T	Microscopie et Diffraction électronique
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.)	WIEMANN	T	Chimie organique et structurale
LAFFITTE	T	Chimie générale	JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay)
FAVARD	T	Géométrie supérieure	VASSY	T	Physique de l'atmosphère
COULOMB	T	Physique du Globe	DESTOUCHES ...	T	Théories physiques
Mlle COUSIN ...	T	Biologie animale (S.P.C.N.)	AMIEL	T	Chimie générale
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale	HOCART	T	Minéralogie et Cristallographie
DRACH	T	Zoologie	J.-P. MATHIEU .	T	Physique (Optique)
KASTLER	T	Physique (E.N.S.)	COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.)
ÉPHRUSSI	T	Génétique	MAY	T	Zoologie (Orsay)
RIVIÈRE	T	Géologie S.P.C.N. et sédim.	CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie
GAUTHERET ...	T	Biologie végét. (P.C.B.)	FELDMANN	T	Biologie végétale marine
R. LUCAS	T	Recherches physiques	GUINIER	T	Physique des Solides (Orsay)
A. THOMAS ...	T	Biologie cellulaire	JOST	T	Physiologie comparée
ARNULF	T	Optique appliquée	FORTET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique
MORAND	T	Physique Enseignement	SCHWARTZ	T	Calcul différentiel et Intégral
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.)	CHOUARD	T	Physiologie végétale
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides	MALAVARD	T	Aviation (Technique aéronautique)
DANJON	T	Astronomie	BRELOT	T	Calcul diff. et intégral
PETIT	T	Biologie maritime	NORMANT	T	Synthèse organique générale
QUENEY	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique			
GALLIEN	T	Embryologie			

BÉNARD	T	Chimie minérale	MOYSE	T	Physiologie végétale (Orsay)
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.)	NOIROT		Evolution des Etres org.
DUGUÉ	T	Statistiques mathématiques	PANNETIER	T	Chimie générale (Orsay)
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie	POSSOMPES	T	Zoologie
ULRICH	T	Physiologie végétale	PULLMANN	T	Chimie théorique
MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée	TEILLAC	T	Physique nucléaire et Radioactivité
KIRRMANN	T	Théories chimiques	TONNELAT	T	Biologie physico-chimique
CHADEFAUD	T	Botanique	VILLE	T	Econométrie
Mlle LE BRETON	T	Physiologie de la nutrition	WILLEMART		Chimie (P.C.B.)
SALEM	T	Mathématiques générales	DODE	T	Chimie (Orsay)
LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie	FREYMANN	T	Recherches physiques
DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées	GUINOCHE	T	Biol. vég. S.P.C.N. (Orsay)
EHRESMANN	T	Topologie algébrique	ROLLET	T	Chimie (P.C.B.)
FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.)	Mlle JOSIEN	T	Chimie (S.P.C.N.)
GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique	CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes
GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.)	ARNOULT	T	Electronique (Orsay)
PISOT	T	Technique Mathém. de la Physique	CHAPELLE	T	Physique (Orsay)
ROCH	T	Géologie	DELANGE	T	Mathématiques (Orsay)
SCHATZMAN	T	Astrophysique	DENY	T	Mathématiques générales (Orsay)
TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique	GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales	G. LUCAS	T	Géologie
LENNUIER	T	Physique (M.G.P.)	ALLARD	T	Chimie physique
RIZET	T	Génétique (Orsay)	BERTHELOT	T	Physique fondament. des hautes énergies (Orsay)
ROUTHIER	T	Géologie appliquée	BRICARD	T	Météorologie et Physique de l'Atmosphère
Mme TONNELAT	T	Physique théorique	Mme ALBE-FESSARD		Psychophysiologie
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.)	FRIEDEL		Physique des Solides (Orsay)
SOUCHAY	T	Chimie générale	M. JULIA		Etudes des Moléculaires naturelles complexes
AIGRAIN	T	Electrotechnique générale	LENDER	T	Biologie animale (S.P.C.N., Orsay)
BRUSSET	T	Chimie systématique	MAGAT		Physico-chimie des radioéléments
M. LÉVY	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay)	Mlle QUINTIN	T	Electrochimie
Mme CHAIX	T	Chimie biologique	MONOD	T	Chimie du métabolisme
Mme HUREL-PY		Biologie végétale (P.C.B.)	BENOIT	T	Physiol. anim. (Orsay)
PIAUX	T	Chimie (M.P.C.)	DE POSSEL	T	Analyse numérique
BRUN	T	Mécanique théorique des fluides	CHARLOT	T	Chimie analytique
LEDERER	T	Chimie biologique	HAÏSSINSKY	T	Radiochimie
Mme DUBREIL	T	Mathématiques (Agrég.)	LEMÉE	T	Physiol. vég. B.M.P.V. (Orsay)
Mme LE LONG	T	Mathématiques (E.N.S.)	GUÉRIN	T	Chimie M.P.C. (Orsay)
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.)	M. CHATELET		Chimie (P.C.B.)
COTTE	T	Physique électricité	JEAN	T	Physique nucl. (Orsay)
J.-E. DUBOIS	T	Chimie organique	MATTLER	T	Physique S.P.C.N. (Orsay)
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.)	Louis MICHEL		Phys. théor. des Hautes Energies (Orsay)
André MICHEL	T	Chimie minérale (Orsay)	BERGERARD		Zoologie (Orsay)
OLMER	T	Energétique générale	BERTEIN		Electronique (Orsay)
ROUAULT	T	Electricité (Orsay)	BOUSSIÈRES		Chimie des Radioéléments (Orsay)
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée	Mme COUTURE		Thermodynamique et Mécanique physique
BARCHEWITZ	T	Chimie physique			
BROSSEL	T	Physique atomique			
BUSER		Physiologie comparée			
CAMUS		Physiologie végétale (B.M.P.V.)			
CASTAING	T	Physique (Orsay)			
CURIEN	T	Minéralogie et Cristallographie			

ELLENBERGER ..	Géologie appliquée sur le terrain	Mme CHOQUET-BRUHAT	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste
FRANC	Biologie animale (P.C.B.)	Mlle VEIL		Physiologie générale
SCHNELL	Botanique tropicale (Orsay)	LWOFF	T	Microbiologie
STOLKOWSKI ...	Physiologie générale	SIESTRUNCK ...	T	Mécanique physique et expérimentale
ACHER	Chimie biologique (Orsay)	LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires
BAUDOIN	Biologie animale (P.C.B.)	BROCHARD	T	Physique P.C.B. (Orsay)
BEAUMONT	Biologie animale (S.P.C.N.)	CABANNES	T	Mécanique générale
BLAMONT	Géophysique Ionosphère	LESIEUR	T	Mathématiques M.P.C. (Orsay)
BOURREAU	Botanique	MAZET	T	Mécanique générale (Orsay)
D. CURIE	Physique (M.G.P.)	CAIRE		Géographie physique et Géologie dynamique
DURAND-DELGA .	Géologie	COMOLET		Mécanique des fluides
FREON	T Chimie organ. (Orsay)	CORABCEUF		Physiologie animale
HELLER	Physiologie végétale	DELLOUE		Physique de l'exosphère
TORTRAT	Calcul des probabilités	GORENFLOT ...		Botanique II (Orsay)
CAILLEUX	Géologie (S.P.C.N.)	HOUILLON		Biologie animale (P.C.B.)
MAGNAN	T Physique (S.P.C.N.)	J. JULLIEN		Chimie (P.C.B.)
DAUDEL	T Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire	MALGRANGE ...		Tech. math. de la Phys.
		OLIVIER		Anthropologie
Mlle FOURCROY	Biologie végétale (S.P.C.N.)	NOZERAN	T	Botanique II (Orsay)
		BLANC-LAPIERRE		Physique E.N.S. (Orsay)

Secrétaire général R. POUILLAIN



AVANT-PROPOS

Ce travail m'a été proposé par Monsieur le Professeur JAYLE et a été réalisé dans son laboratoire. Qu'il trouve ici l'expression de ma très respectueuse admiration et mon sincère attachement.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur JOST qui a bien voulu présider le jury de ma thèse.

A Monsieur le Professeur LEDERER, qui a accepté de juger ce travail, j'exprime ma reconnaissance pour la compréhension qu'il m'a témoignée, le courage qu'il m'a prodigué et l'intérêt qu'il m'a porté.

J'ai trouvé auprès de Monsieur le Professeur JULIA un accueil d'une grande amabilité ; je lui en exprime ma gratitude.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur HOREAU, Professeur au Collège de France. Au cours de son parrainage au C.N.R.S., il a toujours fait preuve à mon égard d'une sollicitude qui a été pour moi d'un encouragement précieux.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548802_0019

INTRODUCTION

L'objet de ce travail a été, d'une part d'analyser les corticostéroïdes chez l'Homme après administration de corticotropine ou d'hormones corticosurrénales et, d'autre part, d'étudier la forme de leurs conjugaisons.

Ce travail s'inscrit dans un ensemble de recherches qui ont été réalisées depuis plusieurs années par le Professeur JAYLE et ses collaborateurs et qui ont permis d'établir des relations entre la structure des stéroïdes et leurs conjugaisons à l'acide sulfurique ou à l'acide glucuronique.

Pour réaliser cette étude nous avons utilisé des urines provenant de sujets ayant reçu soit une forte dose d'A.C.T.H., soit une surcharge en corticostérone, cortisol ou cortexone.

- Dans le PREMIER CHAPITRE, nous rappelons très brièvement l'état actuel de nos connaissances sur le métabolisme des hormones corticosurrénales.
- Le DEUXIÈME CHAPITRE concerne la méthodologie utilisée :
 - a) Extraction et fractionnement des corticostéroïdes conjugués sur alumine.
 - b) Hydrolyse et solvolysé des corticostéroïdes conjugués.
 - c) Purification des corticostéroïdes libres et libérés par hydrolyse.
 - d) Chromatographie sur papier et modes de détection des taches de corticostéroïdes.
 - e) Chromatographie sur papier des acétates de corticostéroïdes.
 - f) Purification des corticostéroïdes après élution des chromatogrammes.
 - g) Micro-méthodes d'identification des corticostéroïdes.
 - h) Micro-méthodes d'analyse quantitative des corticostéroïdes.
 - i) Etude spectroscopique dans l'ultra-violet en solution éthanolique, sulfurique, ou phosphorique et étude spectroscopique dans l'infra-rouge.

- Le TROISIÈME CHAPITRE concerne les modes de conjugaison des hormones corticosurrénales actives et de leurs métabolites dans les extraits urinaires après administration d'ACTH.

- Le QUAT
corticostéror
5-ène $3\beta,21$ -
diol 20-one

- Le CINQU
ture d'un Δ_4
dation.

NOMENCLATURE DES DIFFÉRENTS STÉROÏDES UTILISÉS AU COURS DE CES RECHERCHES

STÉROÏDE	NOM ABRÉGÉ	NOM COMMUN
prégna 4-ène 11 β , 17 α , 21-triol 3, 20-dione	F (KENDALL)	cortisol
prégna 4-ène 17 α , 21-diol 3, 11, 20-trione	E (KENDALL)	cortisone
prégna 4-ène 11 β , 21-diol 3, 20-dione	B (KENDALL)	corticostérone
prégna 4-ène 21-ol 3, 11, 20-trione	A (KENDALL)	11-déhydrocorticostérone
prégna 4-ène 17 α , 21-diol 3, 20-dione	S (REICHSTEIN)	17 α -hydroxycortexone
prégna 4-ène 21-ol 3, 20-dione	DOC	cortexone
prégna 4-ène 11 β , 21-diol 18-al 3, 20-dione		aldostérone
prégna 4-ène 11 β , 17 α , 20 α , 21-tétrol 3, 20-dione	20 α -DHF	épi-E (REICHSTEIN)
prégna 4-ène 11 β , 17 α , 20 β , 21-tétrol 3, 20-dione	20 β -DHF	E (REICHSTEIN)
prégna 4-ène 17 α , 20 α , 21-triol 3, 11, 20-trione	20 α -DHE	épi-U (REICHSTEIN)
prégna 4-ène 17 α , 20 β , 21-triol 3, 11, 20-trione	20 β -DHE	U (REICHSTEIN)
5 β -prégnane 3 α , 11 β , 17 α , 21-tétrol 20 one	THF	tétrahydrocortisol
5 α -prégnane 3 α , 11 β , 17 α , 21-tétrol 20 one	allo-THF	allo-tétrahydrocortisol
5 β -prégnane 3 α , 17 α , 21-triol 11, 20-dione	THE	tétrahydrocortisone
5 α -prégnane 3 α , 17 α , 21-triol 11, 20-dione	allo-THF	allo-tétrahydrocortisone
5 β -prégnane 3 α , 11 β , 21-triol 20-one	THB	tétrahydrocorticostérone
5 α -prégnane 3 α , 11 β , 21-triol 20-one	allo-THB	allo-tétrahydrocorticostérone
5 β -prégnane 3 α , 17 α , 21-triol 20-one	THS	tétrahydro 17 α -hydroxycortexone
5 β -prégnane 3 α , 21-diol 11, 20-dione	THA	tétrahydro 11-déhydrocorticostérone

STEROÏDE	NOM ABREGE	NOM COMMUN
5 α -prégnane 3 α , 21-diol 11, 20-dione	allo-THA	allo-tétrahydro 11-déhydrocorticostérone
5 β -prégnane 3 α , 21-diol 20-one	THDOC	tétrahydrocortexone
5 α -prégnane 3 α , 21-diol 20-one	allo-THDOC	allo-tétrahydrocortexone
5 β -prégnane 3 β , 21-diol 20-one	3 β -THDOC	3 β -tétrahydrocortexone
5 α -prégnane 3 β , 21-diol 20-one	allo, 3 β -THDOC	3 β -tétrahydrocortexone
prégna 5-ène 3 β , 21-diol 20-one		21-hydroxyprégnénolone
prégna 4-ène 3, 20-dione		progestérone
prégna 4-ène 18-ol, 3, 20-dione		18-hydroxyprogestérone
prégna 4-ène 18, 21-diol 3, 11, 20-trione		18-hydroxy 11-déhydrocorticostérone
5 β -prégnane 17 α , 21-diol 3, 11, 20-trione	DHE	dihydrocortisone
5 α -prégnane 17 α , 21-diol 3, 11, 20-trione	allo-DHE	allo-dihydrocortisone
5 β -prégnane 11 β , 17 α , 21-triol 3, 20-dione	DHF	dihydrocortisol
5 α -prégnane 11 β , 17 α , 21-triol 3, 20-dione	allo-DHF	allo-dihydrocortisol
5 β -prégnane 17 α , 21-diol 3, 20-dione	DHS	dihydro 17 α -hydroxycortexone
5 β -prégnane 3 α , 17 α , 20 ξ , 21-tétrol	DHDOC	dihydrocortexone
prégna 4-ène 11 β , 20 α , 21-triol	20 α -DHB	20 α -dihydrocorticostérone
prégna 4-ène 11 β , 20 β , 21-triol	20 β -DHB	20 β -dihydrocorticostérone
prégna 4-ène 20 α , 21-diol 11-one	20 α -DHA	20 α -dihydro 11-déhydrocorticostérone
prégna 4-ène 20 β , 21-diol 11-one	20 β -DHA	20 β -dihydrocorticostérone
5 β -prégnane 3 α , 11 β , 21-triol 20-one 18-al		
5 β -prégnane 3 α , 18, 21-triol 20-one		

5 β -prégnane 3 α , 17 α , 20 β , 21-tétrol 11 one	6 β -OH-F	allo-cortolone
5 α -prégnane 3 α , 11 β , 17 α , 20 α , 21-pentol		β -allo-cortol
5 α -prégnane 3 α , 11 β , 17 α , 20 β , 21-pentol		allo-cortolone
5 α -prégnane 3 α , 17 α , 20 α , 21-tétrol 11-one		β -allo-cortolone
5 α -prégnane 3 α , 17 α , 20 β , 21-tétrol 11-one		6 β -hydroxycortisol
prégna 4-ène 6 β , 11 β , 17 α , 21-tétrol 3, 20-dione		étiocholanolone
5 β -androstane 3 α -ol 17-one		3 β -étiocholanolone
5 β -androstane 3 β -ol 17-one		épiandrostérone
5 α -androstane 3 β -ol 17-one		androstérone
5 α -androstane 3 α -ol 17-one		déhydro-épiandrostérone
androsta 5-ène 3 β -ol 17-one	DHA	androstendione
androsta 4-ène 3, 17-dione		adénostérone
androsta 4-ène 3, 11, 17-trione		11 β -hydroxy-androstendione
androsta 4-ène 11 β -ol 3, 17-dione		11 β -hydroxy-androstérone
5 α -androstane 3 α , 11 β -diol 17-one		11-céto-androstérone
5 α -androstane 3 α -ol 11, 17-dione		11 β -hydroxy-étiocholanolone
5 β -androstane 3 α -ol 11, 17-dione		11-céto-étiocholanolone
lactone (20 $\rightarrow$ 18) de l'acide 18-ol 3, 11-dione		
Δ_4 étiocholénique		
lactone (20 $\rightarrow$ 18) de l'acide 18-ol 3-one		
Δ_4 étiocholénique		
lactone (20 $\rightarrow$ 18) de l'acide 11 β -ol 18-oxo 3-one		
Δ_4 étiocholénique		
prégna 5-ène 3 β -ol 20-one		prégnénolone
5 α -androstane 3 β , 17 β -diol		18-hydroxycortexone
prégna 4-ène 18, 21-diol 20-one		

METABOLISME INTERMEDIAIRE DES HORMONES CORTICOSURRENALES

Les corticosurrénales humaines sécrètent trois hormones : le cortisol, pregna 4-ène 11β , 17α , 21-triol 3,20-dione ou composé F de KENDALL, la corticostérone, pregna 4-ène 11β , 21-diol 3,20-dione ou composé B de KENDALL et l'aldostérone, pregna 4-ène, 11β , 21-diol 18-al 3, 20 dione.

Elles produisent également de petites quantités de pregna 4-ène 17α , 21-diol 3, 20-dione ou composé S de REICHSTEIN et dans certaines conditions pathologiques de désoxycorticostérone, pregna 4-ène 21-ol, 3, 20-dione ou composé Q de REICHSTEIN.

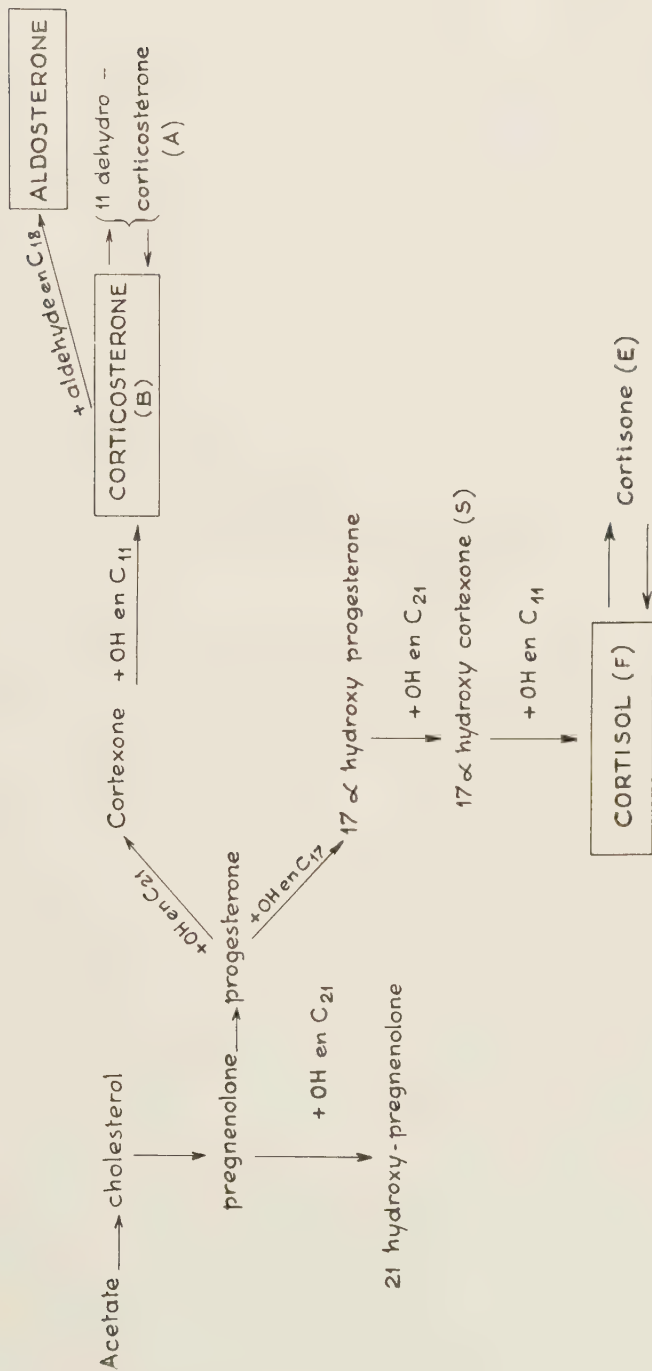
Les deux premières hormones se transforment en cortisone pregna 4-ène, 17α , 21-diol 3, 11, 20-trione ou composé E de KENDALL et en pregna 4-ène 21-ol 3, 11, 20-trione ou composé A de KENDALL. Cela porte à sept le nombre des corticostéroïdes ayant comme caractère commun de posséder un groupe Δ_4 -3-CO et un hydroxyle en C_{21} .

Le schéma 1 rappelle les différents corticostéroïdes qui sont excrétés par les corticosurrénales et leur biogenèse.

MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE DES HORMONES CORTICOSURRENALES

Les hormones corticosurrénales sont réduites en dérivés di-tétra- et hexahydrogénés dans la première partie du métabolisme et ensuite oxydés, donnant ainsi naissance à des 17-cétostéroïdes dans le cas de 17α -hydroxy corticostéroïdes ainsi qu'à des produits d'oxydation plus poussés qui ne sont pas encore connus.

Schéma 1
BIOGENÈSE DES HORMONES SURRÉNALIENNES



MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE DU CORTISOL

Le métabolisme du cortisol fait intervenir des réactions d'hydrogénation et d'oxydation. Ce sont les processus d'hydrogénation qui forment les premiers stades de la transformation de l'hormone et le processus qui s'attaque au squelette carboné représente la dernière étape du métabolisme ; interviennent également des réactions d'équilibre entre le groupement hydroxyle et le carbonyle en C_{11} , ce qui explique qu'une partie importante des métabolites soit des dérivés de la cortisone.

Le schéma 2 indique les différentes étapes du métabolisme intermédiaire du cortisol.

Chez l'Homme, nos connaissances reposent sur les données de l'analyse des corticostéroïdes dans le sang et dans les urines chez des sujets normaux, après administration d'ACTH et après surcharge en stéroïdes éventuellement marqués par des isotopes lourds ou radio-actifs.

La fixation de la première molécule d'hydrogène peut se faire à l'une ou à l'autre extrémité de la molécule, c'est ainsi que l'on a mis en évidence du 20β -dihydrocortisol appelé composé E de REICHSTEIN et du 20α -dihydrocortisol appelé composé épi-E de REICHSTEIN, après administration de cortisol [1, 2].

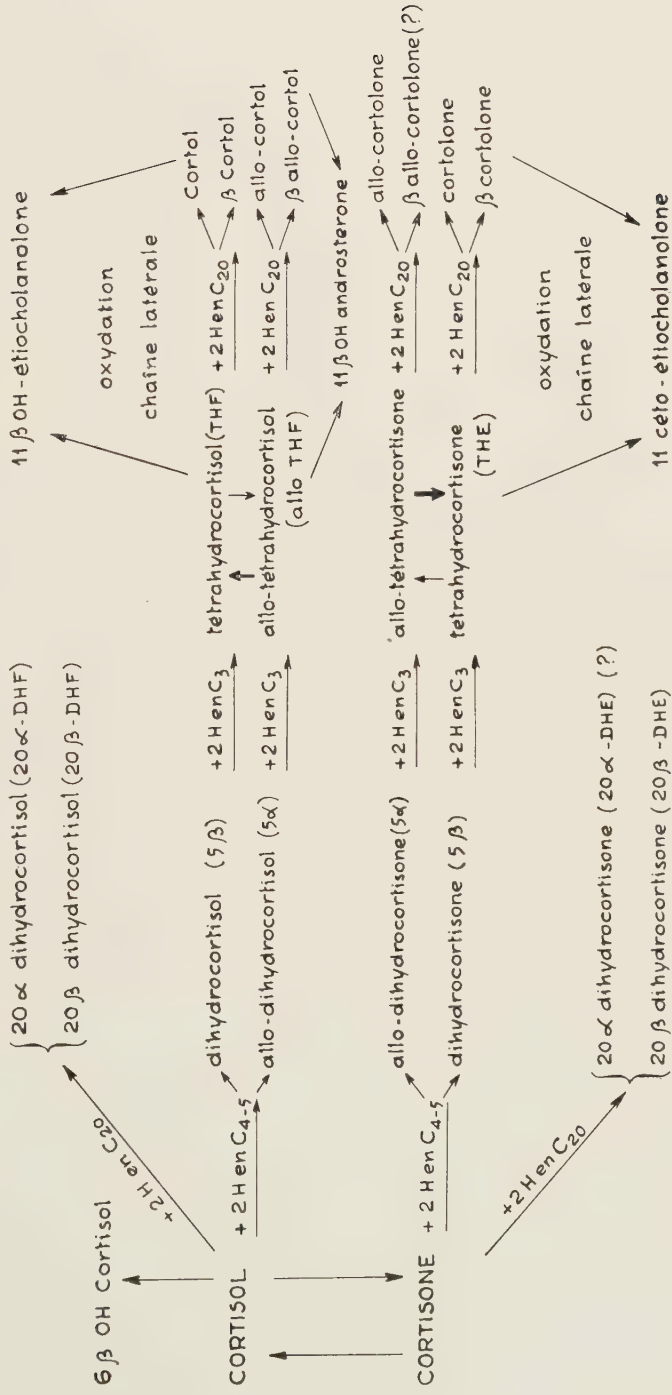
LOMBARDO et HUDSON [3] ont isolé le préгна 4-ène 17α , 20β , 21-triol (20β -DHE) après administration de 750 mg d'acétate de cortisone ; bien que ces auteurs aient trouvé un pourcentage élevé de ce métabolite, on peut considérer que l'hydrogénation en C_{20} de cet hormone n'excède pas 1 % des métabolites totaux.

La voie privilégiée est celle qui intéresse en premier lieu la double liaison en 4-5. Comme ces métabolites ne représentent qu'une étape intermédiaire, on n'en trouve que de très petites quantités dans les urines normales. SCHNEIDER [4] a isolé le 5β -préгнане 17α , 21-diol 3, 11, 20-trione (DHE), mais le 5α -DHE n'a pas été isolé. Si l'on fait le rapport des métabolites ayant le squelette du 5β -préгнане sur ceux qui dérivent du 5α -préгнане, on peut estimer que le rapport $5\beta/5\alpha$ est de l'ordre de 9/1.

La deuxième molécule d'hydrogène réduit le carbone en C_3 . Les seules métabolites connus sont les 3α -hydroxy corticostéroïdes, les isomères 3β hydroxy-corticostéroïdes n'ayant pas été encore isolés. Ce fait est à souligner, d'autant plus que les 3β hydroxy 5α dérivés du cortisol ont été isolés dans les corticosurrénales de bœuf [5] et après perfusion de foie de rat [6].

Schéma 2

MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE DU CORTISOL



Les tétrahydrodérivés du cortisol se subdivisent en deux catégories, selon qu'ils possèdent en C_{11} , un hydroxyle ou un carbonyle. Chez le sujet normal, c'est le 5β -prégnane 3α , 17α , 21 -triol 11 , 20 -dione ou tétrahydrocortisone (THE) qui prédomine, ce qui lui a valu le nom d'urocortisone. Elle a été isolée des urines par SCHNEIDER [4] après administration d'ACTH et ultérieurement par d'autres auteurs.

En revanche, l'isomère 5α (allo-THE) n'a pas pu être isolé d'une façon certaine bien que ROMANOFF et coll. [7] déclarent l'avoir identifié : il a été également identifié par PETERSON et PIERCE [8] après administration de cortisol, mais ces auteurs ne donnent aucuns détails sur son identification.

Il en va différemment du 5α -prégnane 3α , 11β , 17α , 21 -tétrol 20 -one ou allo-tétrahydrocortisol (allo-THF) qui selon plusieurs auteurs représente de 15 à 20 % des métabolites tétrahydrogénés [9, 7]. Le rapport THF/allo-THF est supérieur à l'unité : 1,5-3 [9, 7].

On peut donner à la prédominance de la THE sur la THF et l'allo-THF et aux quantités très faibles d'allo-THE l'explication suivante : une déhydrogénation hépatique doit assurer un équilibre $THE \rightleftharpoons THF$ avec une prédominance de THE, alors que la réaction $allo-THF \rightleftharpoons allo-THE$ doit se faire avec une vitesse très faible dans le sens $allo-THF \rightarrow allo-THE$. BUSH [10], en administrant l'allo-THE à un sujet normal, retrouve dans les urines 26 % de la dose administrée d'allo-THF et seulement 3 % d'allo-THE.

L'ensemble de ces résultats apporte la preuve que la réduction du carbonyle en C_{11} en fonction alcool peut se faire en l'absence du groupement Δ_4 -3-CO qui était considéré par HUBENER et coll. [11] comme indispensable.

L'influence de la structure cis-trans entre les noyaux A et B du prégnane sur la 11β déhydrogénase, peut donc rendre compte à la fois de la prédominance de la THE, de l'absence ou des quantités infimes d'allo-THE et de taux appréciables d'allo-THF.

Ce serait donc à ce stade du métabolisme du cortisol qu'aurait lieu principalement la déshydrogénation de la fonction alcoolique en C_{11} ; le fait que le cortisol représente la quasi-totalité de l'hormone circulante et que le rapport F/E soit très élevé dans le sang et dans les urines, vient à l'appui de cette façon de voir.

On retrouve l'influence de la structure sur la fixation de la troisième molécule de l'hydrogène. En effet, les métabolites hexahydrogénés sont exclusivement constitués par le cortol, la cortolone et leurs isomères respectifs 20β hydroxylés ; ces quatre métabolites constituent 95 % des dérivés hexahydrogénés [12], leurs isomères 5α constituant moins de 5 % des hexahydrodérivés du cortisol et étant cons-

titués principalement d'allo-cortol et de β -allo-cortol ; il n'y a que des traces d'allo-cortolone et la β -allo-cortolone n'a pas été détectée.

Le *tableau I* indique les différents métabolites obtenus, après administration de cortisol $4\text{-}^{14}\text{C}$ par FUKUSHIMA et coll. [12].

TABLEAU I : *Pourcentage des stéroïdes radioactifs dans l'urine après administration de cortisol $4\text{-}^{14}\text{C}$*

Stéroïdes	% de différents métabolites (24 heures après administration.)
Cortol	2
β -cortol	9.8
Cortolone	11.3
β -cortolone	10.3
allo-cortol	0.5
β -allo-cortol	0.7
allo-cortolone	0.3
β -allo-cortolone	0
Tétrahydrocortisol (THF)	17
allo-tétrahydrocortisol (allo-THF)	8.5
tétrahydrocortisone (THE)	23
11 β -HO-étiocholanolone	5
11 β -HO-androstérone	0.8
11 céto-étiocholanolone	12.8

On peut déduire de ces résultats que la conversion des tétrahydrodérivés en hexadérivés est très lente pour les composés ayant le squelette du 5α -prégnane.

Comme la majeure partie des 17-cétostéroïdes qui se forment par coupure de la chaîne latérale dérivé du 5β -androstane ou étiocholane, on peut supposer avec une grande probabilité que cette oxydation a lieu sur les métabolites hexahydrogénés ; sans doute l'oxydation va-t-elle au delà des stéroïdes en C_{19} , puisqu'une partie de la radioactivité urinaire n'est pas retrouvée sous forme de stéroïdes.

Ce qui est important à souligner, c'est que FUKUSHIMA et coll., après administration de cortisol $4\text{-}^{14}\text{C}$, ont trouvé que 90 % des stéroïdes neutres radio-actifs urinaires étaient composés par les 14 stéroïdes du *tableau I*. Si l'on tient compte de ce que ces auteurs n'ont pas étudié les C_{20} dihydrodérivés ni les dérivés oxygénés en C_6 , on se rend compte que l'on a actuellement identifié la quasi-totalité des stéroïdes urinaires provenant du cortisol.

Le seul métabolite du cortisol en C_{16} , isolé des urines, est le prégnane 4-ène 6β , 11β , 17α , 21-tétrol, 3, 20-dione (6β -OH-cortisol [13]); TOUCHSTONE et BLACKMORE [14] ont récemment trouvé des quantités appréciables de 6β -OH-cortisol chez un sujet atteint de maladie de Cushing.

Le *tableau II* donne la liste des métabolites du cortisol actuellement isolés des urines.

TABLEAU II
Métabolites du cortisol isolés des urines humaines

Stéroïde	Auteurs	Source	Référence
Cortisol (F)	Mason et Sprague, 1948	Administration de cortisone à un malade atteint de la maladie d'Addison	(15)
Cortisone (E)	Schneider J. J., 1950	Sujet normal	(16)
	Burton, Zeffaroni, Keutmann, 1950	Sujet normal	(20)
5 β -pregnane 17α , 21-diol 3, 11, 20-trione (DHE)	Schneider, 1952	Sujet normal	(4)
Tétrahydrocortisone (THE)	Schneider, 1952	Sujet normal	(4)
allo-tétrahydrocortisone (allo-THE)	Romanoff et coll., 1957	Sujet normal	(7)
	Peterson et Pierce, 1960	Après administration de cortisol	(8)
Pregne 4-ène 17α , 20 β , 21-triol 3, 11-dione (20 β -DHE)	Lombarbo et Hudson, 1959	Après administration d'acétate de cortisone	(3)
Tétrahydrocortisol (THF)	Lieberman et coll., 1953	Après administration d'ACTH.	(17)
allo-tétrahydrocortisol (allo-THF)	Romanoff et coll., 1957	Sujet normal	(7)
Pregne 4-ène 11β , 17α , 20 β , 21-tétrol 3-one (20 α -DHF)	Peterson et coll., 1955	Sujet normal	(1)
Pregne 4-ène 11β , 17α , 20 α , 21-tétrol 3-one (20 α -DHF)	Peterson et coll., 1957	Sujet normal	(2)
Cortolone	Fukushima et coll., 1955	Après administration d'ACTH	(18)
β -cortolone	Fukushima et coll., 1955	Après administration d'ACTH	(18)
Cortol	Fukushima et coll., 1955	Après administration d'ACTH	(18)
β -cortol	Fukushima et coll., 1955	Après administration d'ACTH	(18)
allo-cortol	Fukushima et coll., 1960	Après administration de cortisol 4-14C	(12)
β -allo-cortol	Fukushima et coll., 1960	Après administration de cortisol 4-14C	(12)
allo-cortolone	Fukushima et coll., 1960	Après administration de cortisol 4-14C	(12)
6 β -hydroxycortisol	Burstein et coll., 1954	Après administration de cortisol	(13)

Une partie très faible de cortisol est éliminée directement par l'urine : 20-40 $\mu\text{g}/24\text{ h}$ selon BURTON, ZAFFARONI et KEUTMAN [19], 41-212 $\mu\text{g}/24\text{ h}$ selon COPE et HURLOCK [20]; 20-95 $\mu\text{g}/24\text{ h}$ selon VERMEULEN et BEKAERT [21]. La cortisone est éliminée en quantité de l'ordre de 20-40 $\mu\text{g}/24\text{ h}$; 20-400 $\mu\text{g}/24\text{ h}$ selon COPE et HURLOCK [20]; 20-95 $\mu\text{g}/24\text{ h}$ selon VERMEULEN et BEKAERT [21].

MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE DE LA CORTICOSTÉRONE

Les principales recherches sur le métabolisme de la corticostérone chez l'homme ont été réalisées par ENGEL et coll. [22, 23], TOUCHSTONE et coll. [24, 25], RICHARDSON et coll. [26, 27], PETERSON et PIERCE [8], etc. ; ces auteurs ont montré que le métabolisme de la corticostérone présente des analogies avec celui du cortisol : cependant, c'est l'allo-THB qui est le métabolite le plus important. Le rapport allo-THB/THB est supérieur à l'unité. Comme dans le cas de dérivés de la cortisone, c'est la THA qui prédomine, la présence d'allo-THA demandant même à être confirmée par des recherches plus poussées.

Les deux autres métabolites connus de la corticostérone sont la 20 β -dihydrocorticostérone (20 β -DHB) [27] et son isomère 20 α [28]. On a également identifié la 20 β -dihydro-11-déhydrocorticostérone (20 β -DHA) [29].

Le schéma 3 montre le métabolisme intermédiaire de la corticostérone.

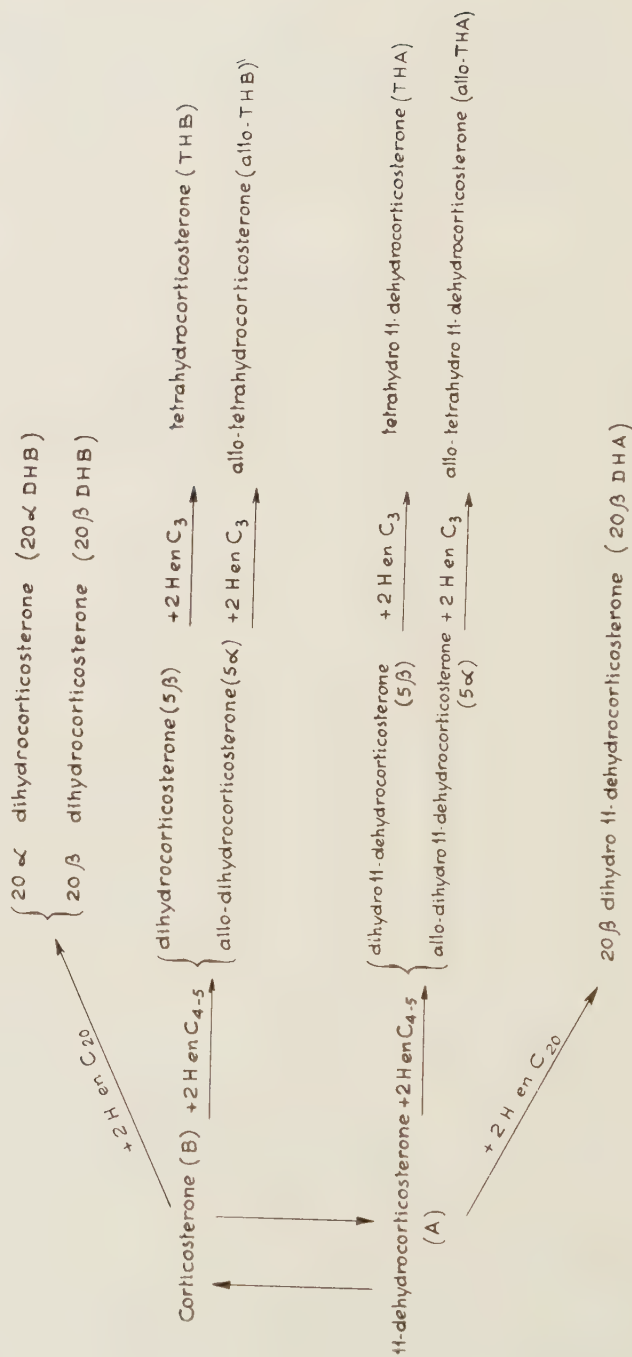
TABLEAU III : *Excrétion urinaire de la corticostéroïde et de ses métabolites en mg/24 h* [29, 8]

Stéroïdes	Sujet normal	ACTH	B (100 mg)	Sujet normal (méthode de double marquage)
B	0.002	0.31	1.00	0.005
THA	0.16	1.00	3.00	0.060
THB	0.12	4.00	6.10	0.120
allo-THA	0.02	0.10	0.50	0.020
allo-THB	0.30	5.20	9.00	0.300

Le tableau III, emprunté à PETERSON [28] et à PETERSON et PIERCE [8], donne les valeurs quantitatives de la corticostérone et de

Schéma 3

MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE DE LA CORTICOSTÉRONÉ



ses métabolites dans l'urine de sujets normaux, après administration d'ACTH, de corticostérone et de corticostérone marquée par $4\text{-}^{14}\text{C}$ ou par du tritium.

Les dérivés hexahydrogénés de la corticostérone n'ont pas été mis en évidence dans les urines, cependant EXLEY et coll. [30], dans un travail récent, dosent dans les urines de sujets normaux les 17-désoxy 20, 21 glycol et les 17-désoxy α -cétols stéroïdes ; ils trouvent que le rapport α -cétol/ α -glycol est de $1/2$; cela laisse supposer qu'une quantité importante de la corticostérone est transformée en dérivés hexahydrogénés. Par leur méthode, ces auteurs évaluent le taux des métabolites de la corticostérone à $3,4\text{ mg}/24\text{ h}$ chez l'homme, et à $3,1\text{ mg}/24\text{ h}$ chez la femme ; cela donne un rapport métabolique de B/F de $1/4$, ce qui ne correspond pas aux résultats de la littérature selon lesquels le rapport de la production de la corticostérone au cortisol serait de $1/10 - 1/20$ [31].

Le *tableau IV* donne la liste des métabolites de la corticostérone isolés dans les urines.

La demi-vie biologique dans le plasma de la corticostérone après administration intraveineuse de corticostérone $4\text{-}^{14}\text{C}$ est de 80-90 minutes, celle de ses métabolites tétrahydrogénés est de 50-60 minutes et la demi-vie biologique dans l'urine est de 150-240 minutes.

La demi-vie biologique dans le plasma du cortisol après injection intraveineuse du cortisol $4\text{-}^{14}\text{C}$ est de 100-110 minutes, mais la demi-vie biologique dans l'urine est de 150-240 minutes [8].

MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE DE LA 17α -HYDROXYCORTEXONE (composé S de REICHSTEIN)

On ne trouve dans le sang des sujets normaux que des traces du composé S ; en revanche, dans la forme hypertensive de l'hypertension congénitale de la corticosurrénale, il devient le corticostéroïde dominant [1].

La substance S a été trouvée chez une malade atteinte de cirrhose du foie [50].

Les valeurs de tétrahydro S (THS) trouvées dans les urines de sujets normaux, après administration d'ACTH et dans différents cas pathologiques, sont indiquées dans le *tableau V*, emprunté à TOUCHSTONE et coll. [36].

TABLEAU IV

Métabolites de la corticostérone isolés dans les urines humaines

Stéroïdes	Auteurs	Sources	Réfê- rence
Corticostérone (B)	Touchstone et coll., 1954	Après administration d'ACTH	(24)
11-déhydrocorticostérone (A)	Touchstone et coll., 1955	Après administration d'ACTH	(25)
11-déhydrocorticostérone (THB)	Engel et coll., 1954	Après administration de corticostérone.	(22)
	Touchstone et coll., 1954	Après administration d'ACTH	(24)
allo-tétrahydrocorticostérone (allo-THB)	Touchstone et coll., 1954	Après administration d'ACTH	(29)
	Engel et coll., 1954	Après administration de corticostérone	(22)
Tétrahydro 11-déhydrocorticostérone (THA)	Touchstone et coll., 1954	Après administration d'ACTH	(24)
	Engel et coll., 1951	Après administration de corticostérone.	(22)
allo-tétrahydro 11-déhydrocorticostérone (allo-THA)	Peterson, 1959	Sujet normal.	(28)
	Peterson et Pierce, 1960	Après administration d'ACTH et de corticostérone	(8)
20β-dihydrocorticostérone (20β-DHB)	Richardson et coll., 1958	Après administration d'acétate de 11-déhydrocorticostérone	(27)
20α-dihydrocorticostérone (20α-DHB)	Bulaschenko et coll., 1960	Après administration de corticostérone.	(29)
20β-dihydro 11-déhydrocorticostérone (20β-DHA)	Bulaschenko et coll., 1960	Après administration de corticostérone et d'ACTH	(29)

TABLEAU V : *Excrétion urinaire de THS dans des cas normaux et pathologiques* [36]

Source	mg/24 h.
Sujets normaux	0.020
Après administration d'ACTH	0.260
Syndrome de Cushing	0.250
Syndrome de Cushing	1.7
Syndrome de Cushing (métastase)	15.00
Hypertension essentielle	0.070

MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE DE LA CORTEXONE (DOC)

Le principal métabolite de la cortexone est le dérivé tétrahydro-géné, il a été obtenu après administration de cortexone [26] et dans un cas d'hyperplasie congénitale de la surrénale [35]. Le dérivé dihydrogéné de la cortexone en C_{4-5} a été mis en évidence chez un malade atteint également d'hyperplasie congénitale [37], mais on manque de précisions sur son identification.

MÉTABOLISME DE L'ALDOSTÉRONE

L'aldostérone, considérée comme l'hormone la plus importante agissant sur l'équilibre hydrominéral, a été découverte par SIMPSON et TAIT en 1952 [38], elle a été mise en évidence dans les urines par LUETSCHER et coll. [38, 39, 40].

Il est possible que l'aldostérone suive la même voie métabolique que les hormones précédentes ; cependant les seuls métabolites connus actuellement sont le 5β -prégnane 3α , 18, 21-triol 11, 20-dione [42] et le 5β -prégnane 3α , 11 β , 21-triol 18-al 20-one [43] et la tétrahydro aldostérone qui aurait été détectée par AYRES et coll. [44].

La production d'aldostérone de la surrénale est de 0,150-0,300 mg/24 h [44, 45].

D'autres auteurs ont indiqué l'existence de la 11-déhydroaldostérone [46]. La quantité d'aldostérone évaluée dans les urines de sujets normaux est de 5-15 μ g/24 h (tableau VI).

Le tableau VII indique les différents corticostéroïdes urinaires dérivés de la 17 α -hydroxycortexone (S), de la cortexone (DOC) et de l'aldostérone.

TABLEAU VI : Aldostérone dans l'urine de sujets normaux et pathologiques

Source	$\mu\text{g}/24 \text{ h.}$	Auteurs	Référence
Sujets normaux	1.6 - 3	Luetscher et Axelrad, 1954	(39)
Sujet adulte avec néphrose	3.1 - 16.5	Luetscher et Johnson, 1954	(47)
Aldostéronisme primaire	3.8	Conn, 1955	(48)
Hyperplasie de la corticosurrénale	4.5	Neher et Wettstein, 1955	(49)

MODES DE CONJUGAISON DES CORTICOSTEROIDES URINAIRES

Il était classique de considérer, avant nos recherches, que les hormones corticosurrénales étaient excrétées dans les urines à l'état libre [52, 1, 8].

Au contraire, leurs métabolites inactifs ne peuvent être directement extraits par des solvants organiques ; ils sont en majeure partie libérés de leur conjugaison par la β -glucuronidase [53, 54, 55, 56, 57, 26], ce qui amène la plupart des auteurs à supposer qu'ils sont excrétés à l'état de glucosiduronates.

Plusieurs glucosiduronates ont été isolés des urines à l'état purifié, ce sont : le glucosiduronate de tétrahydrocortisone après administration de tétrahydrocortisone [59] ; le glucosiduronate de β -cortolone après administration de β -cortolone [60] et les glucosiduronates de : tétrahydroxy 17 α -hydroxycortexone (THS), tétrahydrocortisol et d'allotétrahydrocorticostérone [61].

On sait peu de choses sur la partie des corticostéroïdes qui est sulfoconjuguée et, à notre connaissance, aucun sulfate de corticostéroïde n'a encore été isolé à l'état pur.

TABLEAU VII

Métabolites urinaires du composé S, de la cortexone et de l'aldostérone

Stéroïdes	Auteurs	Source	Réf- érence
17 α -hydroxycortexone (substance S)	Johnson et coll., 1956	Cirrhose du foie	(50)
5 β -pregnane 3 α ,17 α ,21-triol 20-one	Touchstone et coll., 1954	Hyperplasie congénitale de la surrénale	(33)
5 β -pregnane 17 α ,21-diol 3,20-dione (DHS)	Gandy et coll., 1960	Hyperplasie congénitale de la surrénale	(37)
5 β -pregnane 3 α ,17 α ,20 ξ ,21-tétrol	Eberlein et Bongiovanni, 1956	Hyperplasie congénitale de la surrénale	(35)
Tétrahydrocortexone (THDOC)	Eberlein et Bongiovanni., 1956	Hyperplasie congénitale de la surrénale	(35)
5 β -pregnane 21-ol 3,20-dione (DHDOC)	Gandy et coll., 1960	Hyperplasie congénitale de la surrénale	(37)
Aldostérone	Luetscher et Axelrad, 1954	Sujet normal	(39)
5 β -pregnane 3 α ,18,21-triol 11,20-dione	Ulick et Lieberman, 1957	Sujet normal	(42)
Pregna 5-ène 3 β ,21-diol 20-one	Dobriner et Lieberman, 1952	Après administration d'ACTH	(51)

La conjugaison de l'aldostérone paraît occuper une place à part ; en effet, cette hormone est libérée de sa combinaison labile en quelques heures à pH 1 et à la température ambiante [62, 49, 40, 39, 63].

* *

BIBLIOGRAPHIE

1. PETERSON (R.E.), WYNGAARDEN (J.B.), GUERRA (S.L.), BRODIE (B.B.) and BUNIN (J.J.). — *J. Clin. Invest.*, 1955, **34**, 1779.
2. PETERSON (R.E.), PIERCE (C.E.) and KLIMAN (B.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, **70**, 614.
3. LOMBARDO (M.E.) and HUDSON (P.B.). — *J. Biol. Chem.*, 1957, **229**, 181.
4. SCHNEIDER (J.J.). — *J. Biol. Chem.*, 1952, **194**, 337.
5. ZAFFARONI (A.) et BURTON (R.B.). — *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 749.
6. CASPI (E.Y.), LEVY (H.) and HECHTER (O.M.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1953, **45**, 169.)
7. ROMANOFF (L.P.), SEELYE (J.), RODRIGUEZ (R.), PINCUS (G.). — *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 1957, **17**, 434.)
8. PETERSON (R.E.) and PIERCE (C.E.). — *J. Clin. Invest.*, 1960, **5**, 741.
9. BUSH (I.E.) and WILLOUGHBY (M.). — *Biochem. J.*, 1957, **67**, 689.
10. BUSH (I.E.) and MAHESH (V.B.). — *Biochem. J.*, 1959, **71**, 705.
11. HUBENER (H.J.), FUKUSHIMA (D.K.) and GALLAGHER (T.F.). — *J. Biol. Chem.*, 1956, **220**, 499.
12. FUKUSHIMA (D.K.), BRADLOW (H.L.), HELLMAN (L.), ZUMOFF (B.) and GALLAGHER (T.F.). — *J. Biol. Chem.*, 1960, **235**, 2246.
13. BURSTEIN (S.), DORFMAN (R.I.) and NADEL (E.M.). — *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1954, **53**, 307.
14. TOUCHSTONE (J.C.) and BLAKEMORE (W.S.). — *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 1961, **21**, 263.
15. MASON (H.L.), SPRAGUE (R.G.). — *J. Biol. Chem.*, 1948, **175**, 451.
16. SCHNEIDER (J.J.). — *J. Biol. Chem.*, 1950, **183**, 365.
17. LIEBERMAN (S.), KATZENELLENBOGEN (E.R.), SCHNEIDER (R.), STUDER (P.E.) and DOBRINER (K.). — *J. Biol. Chem.*, 1953, **205**, 87.

18. FUKUSHIMA (D.K.), LEEDS (N.S.), BRADLOW (H.L.), KRITCHEVSKY (T.H.), STOKEM (M.B.) and GALLAGHER (T.F.). — *J. Biol. Chem.*, 1955, **212**, 449.
19. BURTON (R.B.), ZAFFARONI (A.) and KEUTMANN (E.H.). — *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 769.
20. COPE (C.L.) and HURLOCK (B.). — *Clin. Sci.*, 1954, **13**, 69.
21. VERMUELEN (A.) and BEKAERT (J.). — *Ann. Endocrinol. (Paris)*, 1954, **15**, 934.
22. ENGEL (L.L.), CARTER (P.) and SPRINGER (M.J.). — *Federation Proc.*, 1954, **13**, 204.
23. ENGEL (L.L.), CARTER (P.), FIELDING (L.C.). — *J. Biol. Chem.*, 1955, **213**, 99.
24. TOUCHSTONE (J.C.), BULASCHENKO (H.), RICHARDSON (E.M.) and DOHAN (F.C.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, **52**, 284.
25. TOUCHSTONE (E.C.), BULASCHENKO (H.) and DOHAN (F.C.). — *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 1955, **15**, 760.
26. RICHARDSON (E.M.), TOUCHSTONE (J.C.), DOHAN (F.C.), BULASCHENKO (H.), LANDOLT (I.) and APPLIN (W.). — *J. Clin. Invest.*, 1955, **34**, 285.
27. RICHARDSON (E.M.), BULASCHENKO (H.) and DOHAN (F.C.). — *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 1958, **18**, 666.
28. PETERSON (R.E.). — *Recent Progr. Hormon Research*, 1959, **15**, 231.
29. BULASCHENKO (H.), RICHARDSON (E.M.) and DOHAN (F.C.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, **87**, 81.
30. EXLEY (D.), INGALL (S.C.), NORYMBERSKI (J.K.) and WOODS (G.F.). — *Biochem. J.*, 1961, **81**, 428.
31. PETERSON (R.E.). — *J. Biol. Chem.*, 1957, **225**, 25.
32. EBERLEIN (W.R.) and BONGIOVANNI (A.M.). — *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 1955, **15**, 153.
33. TOUCHSTONE (J.C.), RICHARDSON (E.W.), BULASCHENKO (H.), LANDOLT (I.) and DOHAN (F.C.). — *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 1954, **14**, 676.
34. ROSSELET (J.P.), OVERLAND (L.), JAILER (J.W.) and LIEBERMAN (S.). — *Helv. Chim. Acta*, 1954, **37**, 1933.
35. EBERLEIN (W.R.) and BONGIOVANNI (A.M.). — *J. Biol. Chem.*, 1956, **223**, 85.

36. TOUCHSTONE (J.C.), BULASCHENKO (H.), RICHARDSON (E.M.) and DOHAN (F.C.). — *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 1957, **17**, 250.
37. GANDY (H.M.), KEUTMAN (E.H.) and IZZO (A.J.). — *J. Clin. Invest.*, 1960, **39**, 364.
38. SIMPSON (S.A.), TAIT (J.F.). — *Endocrinol.*, 1952, **50**, 150.
39. LUETSCHER (J.A., Jr.) and AXELRAD (B.J.). — *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 1954, **14**, 1086.
40. LUETSCHER (J.A., Jr.), NEHER (R.) and WETTSTEIN (A.). — *Experientia*, 1954, **10**, 456.
41. LUETSCHER (J.A., Jr.). — *Abst. Symposium on adrenol Function in Infants and Children*, State Univ. of New York, Syracuse, 1954, **57**.
42. ULICK (S.) and LIBERMAN (S.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 6567.
43. ULICK (S.). — *Communication personnelle*.
44. AYRES (P.J.), GARROD (O.), TAIT (S.A.), TAIT (J.F.) and PEARLMAN (W.H.). — *Ciba Colloquia Endocrinol.*, 1957, **11**, 309.
45. ULICK (S.), LARAGH (J.H.), LIEBERMAN (S.) and LOEB (R.F.). — *Trans. Assoc. Am. Physicians.*, 1958, **71**, 225.
46. NOWACZYNSKI (W.J.), STEYERMARK (P.R.), KOIW (E.), GENEST (J.) and JONES (R.N.). — *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 1956, **34**, 1023.
47. LUETSCHER (J.A., Jr.) and JOHNSON (B.B.). — *J. Clin. Invest.*, 1954, **33**, 1441.
48. CONN (J.W.). — *J. Lab. Clin. Med.*, 1955, **45**, 3.
49. NEHER (R.) and WETTSTEIN (A.). — *Acta Endocrinol.*, 1955, **18**, 386.
50. JOHNSON (D.F.), HEFTMANN (E.) and HAYDEN (A.L.). — *Acta Endocrinol.*, 1956, **23**, 341.
51. DOBRINER (K.) and LIEBERMAN (S.). — *Ciba Colloquia Endocrinol.*, 1952, **2**, 381.
52. NEHER (R.). — *Proc. IV International Congr. of Biochem.* Edit. E. Mosettig, 1958, vol. IV, 128.
53. BUEHLER (H.J.), KATZMANN (P.A.), DOISY (P.P.) and DOISY (E.A.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1949, **72**, 297.
54. MASON (H.L.). — *Recent Progr. Hormon Research*, 1954, **9**, 267.
55. COHEN (S.L.). — *J. Biol. Chem.*, 1951, **192**, 147.
56. KINSELLA (R.A.) and GLICK (J.H. Jr.) and DOISY (R.J.). — *Federation Proc.*, 1950, **9**, 190.

57. BAGGETT (B.), KINSELLA (R.A.) and DOISY (E.A.). — *J. Biol. Chem.*, 1953, **203**, 1013.
 58. GALLAGHER (T.F.), BRADLOW (H.L.), FUKUSHIMA (D.K.), BEER (Ch.T.), KRITCHEVSKY (T.H.), STOKEM (M.B.), EIDINOFF (M.L.), HELLMANN (L.) and DOBRINER (K.). — *Recent Prog. Hormon Research*, 1954, **9**, 411.
 59. SCHNEIDER (J.J.), LEWBART (M.L.), LEVITAN (P.) and LIEBERMAN (S.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 4184.
 60. SCHNEIDER (J.J.) and LEWBART (M.L.). — *Recent Prog. Hormon Research*, 1959, **15**, 201.
 61. FOGGIT (F.) and KELLIE (A.E.). — *Biochem. J.*, 1961, **76**, 62.
 62. NEHER (R.) and WETTSTEIN (A.). — *J. Clin. Invest.*, 1956, **35**, 800.
 63. VENNING (E.H.) and DYRENFURTH (I.). — *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 1956, **16**, 426.
-

TECHNIQUES

Dans ce chapitre, nous décrirons les méthodes que nous avons utilisées dans notre travail, qu'il s'agisse de méthodes empruntées à d'autres auteurs ou de techniques que nous avons mises au point pour résoudre un problème qui nous était posé.

Nous n'indiquerons que leur principe et nous résumerons leur mode opératoire.

I. — EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT DES CORTICOSTEROIDES CONJUGUÉS

Dans la première partie de ce travail, nous avons dû faire un choix entre deux méthodes d'extraction des corticostéroïdes libres et conjugués et deux méthodes de chromatographie sur alumine.

1) *Méthodes d'extraction*

a) Les urines, additionnées de 5 % de NaCl (p/v) sont extraites, à pH 7, par trois fois un volume de n-butanol.

b) Les urines, additionnées de 50 % (p/v) de sulfate d'ammonium sont extraites, à pH 7, par le mélange éther-éthanol (3/1 v/v), trois fois [1].

2) *Méthodes de fractionnement des stéroïdes conjugués*

a) *Méthode de Crépy et coll. [2] :*

Les extraits urinaires sont adsorbés sur alumine, élués par du n-butanol contenant des quantités croissantes d'eau et, finalement, par le mélange n-butanol-NH₄OH 0,1 N.

b) *Méthode de Barlow* [3] :

Les extraits urinaires sont adsorbés sur l'alumine et élués par de l'éthanol à 96 %, par de l'éthanol à 50 % et par un tampon 0,2 M (pH : 6,0) $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{ac. citrique}$.

Les critères sur lesquels nous avons établi notre choix ont été, d'une part, le pourcentage de récupération des stéroïdes conjugués dans les fractions ester-sulfates et glucosiduronates et, d'autre part, la meilleure séparation des deux fractions de conjugués.

RÉSULTATS

Dans la première partie de notre travail, nous avons comparé l'extraction des corticostéroïdes conjugués par le n-butanol d'une part, et, d'autre part, par le mélange éther/éthanol 3/1 v/v.

TABLEAU VIII : *Etude comparative de l'élu-tion des stéroïdes conjugués, adsorbés sur colonne d'alumine*

METHODE KELLIE			METHODE CREPY		
Quantité de stéroïdes conjugués chromatographiés	SO_4DHA	Gl.A		SO_4DHA	Gl.A
	1500 μg	764 μg		1500 μg	707 μg
Quantité récupérée dans chaque fraction					
a) éther/éthanol	0	0	a) éther/éthanol (3/1 v/v)	0	0
b) éthanol à 96 %	1614	0	b) n-butanol à 2 % d'eau	0	0
c) éthanol à 50 %	37	0	c) n-butanol à 6 % d'eau	1440	0
d) tampon 0.2 M (pH 6.0) $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{a. critique}$	60	766	d) n-butanol à 10 % d'eau	0	0
			e) n-butanol à 15 % de H_4NOH 0.1 N	0	738
Pourcentage de récupération totale	108	100		96	105

SO_4DHA : sulfate de déhydroépiandrostérone et de sodium

Gl A : glucosiduronate d'androstérone

Il s'est avéré qu'en extrayant par le n-butanol des urines additionnées de 5 % de NaCl à pH 7,0, on n'extrait qu'environ seulement 60 % des corticostéroïdes totaux.

Avec la méthode d'EDWARDS et KELLIE, la récupération est de 85-90 %.

Après avoir standardisé l'alumine selon la méthode indiquée par BROCKMANN et SCHODDER [4], nous avons comparé du point de vue quantitatif la méthode de BARLOW avec celle de CRÉPY et coll.

Le *tableau VIII* montre les résultats obtenus avec le sulfate de déhydroépiandrostérone de synthèse (F : 172°) et avec le glucosiduronate d'androstérone purifié *.

On voit sur ce tableau que la récupération est quantitative dans les deux cas.

En revanche, on constate que la séparation des deux conjugués est meilleure avec la méthode de CRÉPY qu'avec la méthode d'EDWARDS.

Dans le premier cas, il existe une solution de continuité entre les éluats contenant l'ester-sulfate et ceux contenant le glucosiduronate. Au contraire, avec la méthode de BARLOW, les deux fractions se chevauchent dans plusieurs tubes.

La même étude réalisée sur des extraits urinaires riches en corticostéroïdes conjugués a donné les mêmes résultats qu'avec les stéroïdes conjugués purs.

Pour ces raisons, nous avons opéré comme suit :

- 1) Extraction des corticostéroïdes par la méthode d'EDWARDS et coll.
- 2) Reprise de l'extrait par 200 ml de n-butanol contenant 5 % d'éthanol.
- 3) Application sur colonne de 22 grammes d'alumine BROCKMANN type II-III.
- 4) Elution des corticostéroïdes conjugués par :
 - 200 ml de n-butanol à 2 % d'eau ;
 - 250 ml de n-butanol à 6 % d'eau ;
 - 200 ml de n-butanol à 10 % d'eau ;
 - 400 ml de n-butanol à 15 % de NH_4OH 0,1 N.
- 5) Séparation de l'éluat en fractions de 10 ml par un collecteur automatique.
- 6) Dosage des ester-sulfates par la méthode de VLITOS-ROY-CRÉPY [5, 6, 7] dont nous rappellerons le principe : après addition de bleu de méthylène à l'extrait aqueux, le complexe sulfate de stéroïde-bleu de méthylène est extrait par le chloroforme.

(*) Ce glucuronide a été obtenu à l'état pur par CRÉPY à partir d'extraits urinaires d'un enfant auquel une charge d'androstérone a été administrée.

La densité optique est comparée à celle que l'on obtient avec des quantités comprises entre 5 et 40 μg de sulfate de déhydroépiandrosterone et de sodium.

- 7) Dosage du glucosiduronate par la réaction de TOLLENS [8], selon la modalité de JAYLE et CRÉPY [9].

II. — PURIFICATION DES GLUCOSIDURONATES DE CORTICOSTEROIDES PAR CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR COLONNE DE CÉLITE

Cette technique sera décrite dans le paragraphe : « Identification du glucosiduronate de 5β -prégnane 3α , 21-diol 20-one » (p. 103).

III. — HYDROLYSE ET SOLVOLYSE DES CORTICOSTÉROIDES CONJUGUÉS

1) *Hydrolyse enzymatique*

L'extrait sec contenant les corticostéroïdes conjugués est dissous dans une solution tampon acide acétique/acétate de sodium 0,2 M à pH 4,7. Les ester-sulfates sont hydrolysés par la sulfatase et les glycosiduronates par la β -glucuronidase.

a) *La sulfatase :*

A été purifiée par la méthode de JARRIGE [10], à partir du suc digestif d'*Helix pomatia*. On l'ajoute à la solution d'ester-sulfate obtenue, en se rapportant au volume urinaire d'origine et à raison de 500 unités d'enzyme par ml d'urine. L'activité enzymatique est évaluée par la méthode de ROY en utilisant le sulfate de nitrocatéchol [6].

b) *La β -glucuronidase :*

A été purifiée par la méthode d'ALFSEN [11] à partir du suc digestif d'*Helix pomatia*. On l'ajoute à la solution de glucosiduronate en se rapportant au volume urinaire d'origine et à raison de 500 unités d'enzymes par ml d'urine.

L'activité est évaluée en unités FISHMAN, en utilisant comme substance le β -glucosiduronate de phénolphtaléine [12].

c) *Extraction des stéroïdes libérés :*

La solution hydrolysée est extraite 3 fois par 1 v de dichlorométhane. Les extraits sont lavés par 0,05 v de Na_2CO_3 à 9 % (p/v) et 2 fois par 0,05 v d'eau.

2) *Hydrolyse en milieu acide*

Les urines sont amenées à pH 1,0 avec HCl et extraites pendant 48 h par le dichlorométhane.

3) *Solvolyse*

a) *En solution* (d'après la technique de COHEN et ONESON [13]) :

Ce mode d'hydrolyse a été utilisé pour les ester-sulfates.

— *Mode opératoire :* les ester-sulfates sont dissous dans 10 ml de dichlorométhane contenant 5 % d'acide trichloracétique ; on chauffe 10 minutes au bain-marie bouillant. On ajoute 1 ml d'eau et on neutralise. Après avoir ajusté le pH à 7,0, le dioxane est chassé, on ajoute 10 ml d'eau et on extrait 3 fois par 1 v de dichlorométhane.

b) *Solvolyse des conjugués sur le chromatogramme :*

Nous avons utilisé les deux procédés suivants :

— *modification de la technique de SCHNEIDER et LEWBART [14] :* le chromatogramme est placé dans une atmosphère de dioxane contenant 25 % de ClH et on le laisse pendant 3 h 1/2 à 40°C ;

— *modification de la technique de COHEN et ONESON :* le chromatogramme est plongé dans une solution à 3 % (p/v) d'acide trichloracétique dans le dioxane et laissé pendant 10 minutes à 90°C.

En utilisant ces deux procédés, on révèle, d'une part l'ion sulfate [25], et d'autre part le stéroïde libéré, par des réactions caractéristiques.

IV. — PURIFICATION DES CORTICOSTÉROÏDES LIBRES

Afin d'éliminer les stéroïdes peu polaires, une méthode de purification sur florisil activé a été employée.

ACTIVATION DU FLORISIL

Après lavage par l'éthanol, le florisil est activé à 600°C pendant 4 h. La colonne de florisil est faite dans le dichlorométhane ; l'extrait

contenant les stéroïdes est dissous dans le dichlorométhane, adsorbé sur la colonne de florisil et élué par les solutions suivantes :

- a) 80 ml de dichlorométhane pur ;
- b) 80 ml de dichlorométhane contenant 1,5 % de méthanol ;
- c) 150 ml de dichlorométhane contenant 12 % de méthanol ;
- d) 80 ml de méthanol pur.

90 % - 95 % des corticostéroïdes sont élués dans la fraction c.

V. — CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Nous décrirons les différents systèmes chromatographiques sur papier utilisés pour les corticostéroïdes libres acétylés et pour les glucosiduronates et les ester-sulfates.

1) *Chromatographie des corticostéroïdes libres*

La *figure 1* montre la séquence habituelle dans différents systèmes chromatographiques utilisés dans le but de l'identification de différents corticostéroïdes.

La nomenclature utilisée sur cette figure est la même que celle indiquée dans l'introduction.

Le mélange des corticostéroïdes est chromatographié dans le système chloroforme-formamide [15] et séparé en trois fractions de polarités différentes :

- fraction I : contenant les corticostéroïdes polaires ;
- fraction II : contenant les corticostéroïdes de polarité moyenne ;
- fraction III : contenant les corticostéroïdes peu polaires.

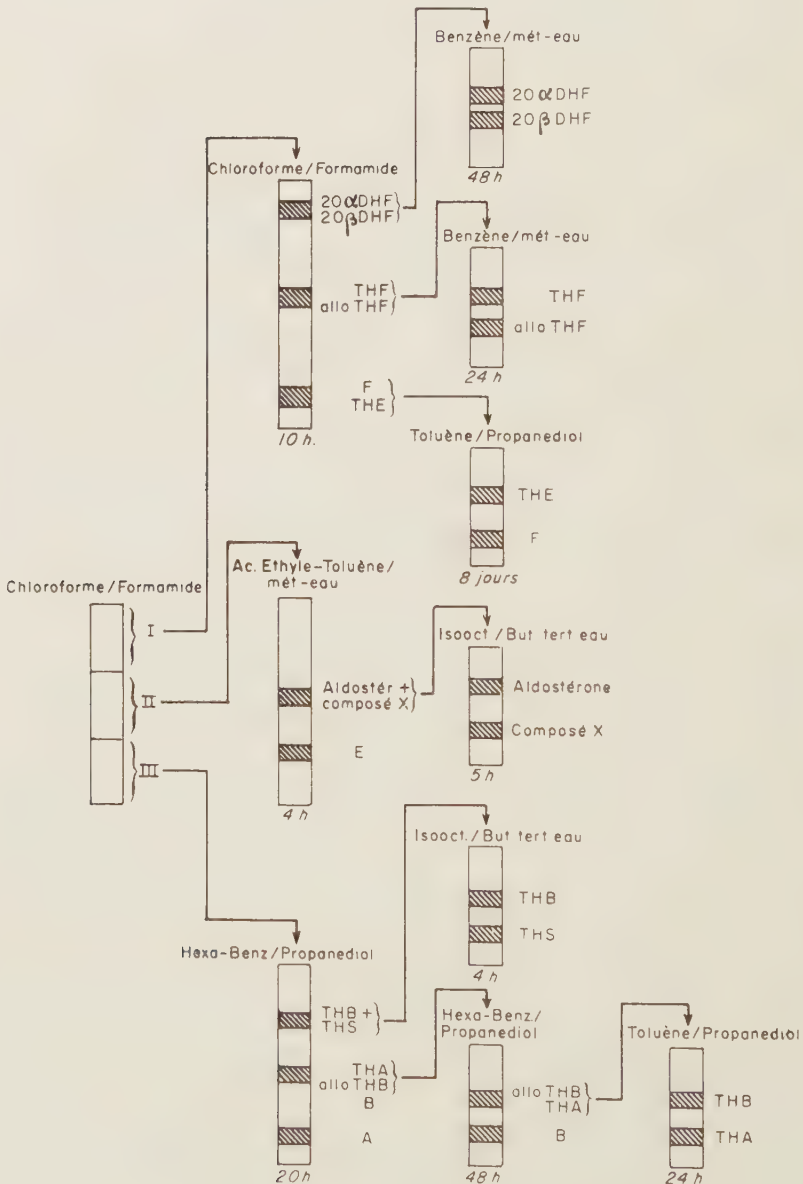
a) La fraction I est chromatographiée à nouveau dans le système chloroforme/formamide et successivement dans les systèmes benzène/méthanol-eau 2/1-1 [16] et toluène/propanediol [17], ce qui permet de séparer selon un ordre de polarité décroissant les corticostéroïdes suivants : pré-gna-4-ène 11 β , 17 α , 20 α , 21-tétrol 3, 20-dione (20 α -DHF), pré-gna-4-ène 11 β , 17 α , 20 β , 21-tétrol 3, 20-dione (20 β -DHF), tétrahydrocortisol (THF), allo-tétrahydrocortisol (allo-THF), tétrahydrocortisone (THE) et cortisol (F).

b) La fraction II, contenant les corticostéroïdes de polarité moyenne, est chromatographiée successivement dans les systèmes : acétate d'éthyle-toluène/méthanol-eau (1-9/5-5) [15] et isooctane/butanol-eau (10/5-9) [18] pour séparer la cortisone (E) et l'aldostérone ainsi qu'un composé X₁ dont nous parlerons p. 115.

c) La fraction III peu polaire est chromatographiée dans les systèmes hexane-benzène (1-1)/propanediol [19] ; isooctane/butanol-

FIGURE 1

Schéma du fractionnement chromatographique des corticostéroïdes



eau (10/5-9) et toluène/propanediol, pour séparer la tétrahydrocorticostérone (THB), l'allo-tétrahydrocorticostérone (allo-THB), la corticostérone (B), la tétrahydro 17 α -hydroxycortexone (THS), la tétrahydrodéhydrocorticostérone (THA), la 11-déhydrocorticostérone (A).

RÉVÉLATION DES CORTICOSTÉROÏDES SUR LE CHROMATOGRAMME

a) Adsorption à 254 m μ pour la détection de la fonction Δ_1 3-CO [16].

b) Réaction au bleu de tétrazolium [chlorure de 3,3' dianisol-bis 4,4'-(3,5 diphényl) tétrazolium] pour la détection de la chaîne latérale α -cétoïque [21, 22]. Réactifs :

— solution A : bleu de tétrazolium à 0,1 % p/v dans H₂O ;

— solution B : NaOH 2,0 N.

c) Mélanger 1 volume de A et 10 volumes de B. Fluorescence à la soude en lumière de WOOD à 360 m μ pour la détection de la fonction Δ_1 3-CO [16].

d) Fluorescence en lumière de WOOD après traitement par H₃PO₄ à 15 % v/v [23]. Les 11-désoxycorticostéroïdes donnent une fluorescence rose, les 11-cétocorticostéroïdes une fluorescence verte et les 11-hydroxycorticostéroïdes une faible fluorescence jaune-verte.

2) *Chromatographie sur papier des acétates de corticostéroïdes*

FORMATION DE L'ACÉTATE DE CORTICOSTÉROÏDE

Le stéroïde est acétylé dans le mélange anhydride acétique-pyridine (200 μ g de stéroïde, 0,2 ml d'anhydride acétique et 0,2 ml de pyridine) et laissé 18 h à la température ambiante.

La solution est évaporée à sec et les traces de réactifs sont éliminées par addition et évaporation de benzène, puis de méthanol.

a) *Chromatographie de partage sur papier des acétates de corticostéroïdes :*

Le tableau IX montre les différents systèmes utilisés pour la chromatographie des acétates de corticostéroïdes et le mode de révélation des taches.

b) *Chromatographie sur papier des acétates de stéroïdes peu polaires :*

La méthode de chromatographie des acétates de stéroïdes peu polaires a fait l'objet d'un travail original qui sera décrit en détail p. 108.

3) *Chromatographie sur papier des ester-sulfates de corticostéroïdes*

La séparation chromatographique des 21-sulfates de corticostéroïdes a fait l'objet d'un travail original qui sera décrit p. 78.

DÉTECTIONS DES TACHES SUR LE CHROMATOGRAMME

a) *Détection des ester-sulfates :*

Le complexe stéroïde-sulfate est détecté sur le chromatogramme par la technique mise au point par O. CRÉPY [24].

Le chromatogramme est plongé dans une solution de bleu de méthylène et, après avoir enlevé l'excès de réactif, il est immergé dans le chloroforme pendant quinze minutes ; les ester-sulfates donnent une tache blanche sur un fond bleu.

b) *Détection de l'ion sulfate libéré par solvolysé ou hydrolyse (technique de BURMA) [25] :*

1) *Réactifs :*

- Solution de 40 mg de BaCl_2 dans 100 ml d'éthanol à 75 %.
- Solution de 25 mg de rhodizonate de potassium dans 30 ml d'eau, complétée à 100 ml par 20 ml de NH_4OH concentré et 50 ml d'éthanol absolu.

2) *Mode opératoire :* le chromatogramme est plongé dans la solution a, séché à l'air et plongé dans la solution b. 3-5 μg d'ester-sulfate sont détectés (tache jaune sur un fond rose).

c) *Détection des corticostéroïdes libérés :*

Les différents corticostéroïdes libérés après solvolysé sont détectés par la réaction au bleu de tétrazolium [21, 22].

VI. — MÉTHODES DE PURIFICATION DES CORTICOSTÉROÏDES LIBRES ET DE LEURS ACÉTATES APRÈS ÉLUTION DU CHROMATOGRAMME

Cette purification a été réalisée en vue de l'identification des différents stéroïdes par spectrophotométrie dans l'ultra-violet, le visible et l'infra-rouge.

TABLEAU IX

Systèmes utilisés pour la chromatographie des acétates de corticostéroïdes

Acétates	Systèmes chromatographiques	Durée	Révélation	
			Bleu de tétrazolum	Fluorescence en milieu sodique
21-mono-acétate de cortisol	Toluène/propanediol	5 h	Positive	Positive
21-mono-acétate de cortisone	Toluène/propanediol	4 h	Positive	Positive
21-mono-acétate de corticostérone	Hexane-benzène (1-1)/formamide	6 h	Positive	Positive
21-mono-acétate de 11-déhydrocorticostérone	Hexane-benzène (1-1)/formamide	6 h	Positive	Positive
18,21-diacétate d'aldostérone	Cyclohexane-benzène (1-1)/formamide	6 h	Positive	Positive
20,21-diacétate de 20 α -hydroxycortisol	Toluène/propanediol	5 h	Négative	Positive
20,21-diacétate de 20 β -hydroxycortisol	Toluène/propanediol	5 h	Négative	Positive
3,21-diacétate de tétrahydrocortisol	Hexane-benzène (1-1)/propanediol	6 h	Positive	Négative
3,21-diacétate d'allo-tétrahydrocortisol	Hexane-benzène (1-1)/propanediol	6 h	Positive	Négative
3,21-diacétate de tétrahydrocortisone	Hexane-benzène (1-1)/propanediol	6 h	Positive	Négative
3,21-diacétate de tétrahydrocorticostérone	Méthylcyclohexane/propanediol	15 h	Positive	Négative
3,21-diacétate d'allo-tétrahydrocorticostérone	Méthylcyclohexane/propanediol	15 h	Positive	Négative
3,21-diacétate de tétrahydro-11-déhydrocorticostérone	Méthylcyclohexane/propanediol	15 h	Positive	Négative
3,21-diacétate de tétrahydro-17 α -hydrocortexone	Méthylcyclohexane/propanediol	15 h	Positive	Négative

1) *Corticostéroïdes libres*

a) *Purification par les solvants :*

L'éluat du chromatogramme est évaporé à sec, dissous dans l'eau et extrait 3 fois par 1 v de dichlorométhane.

b) *Purification sur gel de silice :*

Le stéroïde, dissous dans le dichlorométhane, est adsorbé sur une colonne de 3 g de gel de silice et est élué avec les solvants suivants :

- 1) 20 ml de dichlorométhane ;
- 2) 20 ml de dichlorométhane à 5 % d'acétate d'éthyle ;
- 3) 20 ml de dichlorométhane à 10 % d'acétate d'éthyle ;
- 4) 40 ml de dichlorométhane à 50 % d'acétate d'éthyle ;
- 5) 40 ml de dichlorométhane à 80 % d'acétate d'éthyle ;
- 6) 40 ml d'acétate d'éthyle ;
- 7) 40 ml d'acétate d'éthyle à 5 % d'acétone ;
- 8) 40 ml d'acétate d'éthyle à 10 % d'acétone ;
- 9) 40 ml d'acétate d'éthyle à 50 % d'acétone ;
- 10) 40 ml d'acétone ;
- 11) 40 ml d'acétone à 50 % d'éthanol.

Les stéroïdes sont élués, selon leur polarité, par les solvants 3 à 8.

2) *Acétates de corticostéroïdes*

Après acétylation, les différents acétates de corticostéroïdes sont adsorbés sur une colonne de 3 grammes de gel de silice faite dans du benzène et ils sont élués avec les solvants suivants :

- 1) 50 ml de benzène ;
- 2) 30 ml de dichlorométhane ;
- 3) 40 ml de dichlorométhane à 10 % d'acétate d'éthyle ;
- 4) 40 ml de dichlorométhane à 30 % d'acétate d'éthyle ;
- 5) 40 ml de dichlorométhane à 50 % d'acétate d'éthyle ;
- 6) 40 ml de dichlorométhane à 80 % d'acétate d'éthyle ;
- 7) 40 ml d'acétate d'éthyle ;
- 8) 40 ml d'acétate d'éthyle à 10 % d'acétone ;
- 9) 40 ml d'acétate d'éthyle à 50 % d'acétone ;
- 10) 40 ml d'acétone.

Les différents acétates de corticostéroïdes sont élués selon leur polarité par les solvants 2 à 8.

VII. — MICROMÉTHODES D'IDENTIFICATION DES CORTICOSTÉROÏDES

Les microméthodes suivantes ont été utilisées pour l'identification des corticostéroïdes :

1) *Transformation du corticostéroïde par oxydation de la chaîne latérale*

Les méthodes d'oxydation utilisées ont été les suivantes :

a) *Oxydation par le bismuthate de sodium [26] :*

40 μ g du corticostéroïde sont dissous dans 2 ml d'une solution d'acide acétique glacial à 50 % d'eau v/v et ils sont oxydés par 25 mg de bismuthate de sodium pendant 1 h 1/2 dans un agitateur à l'obscurité. L'excès de réactif est réduit par 2 ml d'une solution à 6 % de métabisulfite de sodium et le stéroïde oxydé est extrait par 4 fois 1 v de dichlorométhane.

Les extraits sont lavés une fois par 0,05 v d'une solution à 9 % p/v de Na_2CO_3 et deux fois par 0,05 v d'eau.

b) *Oxydation par le trioxyde de chrome [17] :*

50 μ g du corticostéroïde sont dissous dans 1,5 ml d'acide acétique glacial et ils sont oxydés par addition de 1 mg de CrO_3 pendant 18 h à l'obscurité. On ajoute 5 ml d'eau et on extrait 4 fois par un v de dichlorométhane. Les extraits sont lavés par 0,05 v d'une solution à 9 % p/v de Na_2CO_3 , puis par 0,05 v d'eau.

c) *Oxydation par l'acide periodique :*

50 μ g de stéroïde sont dissous dans 0,5 ml de méthanol absolu. On ajoute 0,5 ml d'une solution d'acide periodique 0,02 M (470 mg de $\text{HIO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ dans 100 ml de H_2SO_4 0,3 N). On laisse reposer pendant 18 heures à l'obscurité ; on ajoute 4 ml d'eau ; on amène le pH à 5 par addition de NaOH 0,1 N et on extrait 3 fois par un v d'acétate d'éthyle.

Le tableau X indique les différents corticostéroïdes oxydés, leur mode d'oxydation, les systèmes utilisés pour chromatographier ces produits d'oxydation, et les méthodes de détection des taches.

TABLEAU X

Systèmes utilisés pour chromatographier les produits d'oxydation de quelques corticostéroïdes

Corticostéroïdes	Oxydation	Produits d'oxydation	Systèmes chromatographiques	Durée	Révélation	
					Zimmermann	Fluorescence en milieu sodique
Pregna 4-ène 11 β , 17 α , 20 α , 3-one (20 α -DHF)	Bismuthate CrO_3	Androsta 4-ène 11 β -ol 3, 17-dione (11 β -OH-androsténone)	Hexane-benzène (1-1)/propenediol	4 h	Positive	Positive
		Androsta 4-ène 3, 11, 17-trione (adrénostérone)	Hexane-benzène (1-1) propenediol	4 h	Positive	Positive
		11 β -OH-androsténone	Hexane-benzène (1-1) propenediol	4 h	Positive	Positive
Pregna 4-ène 11 β , 17 α , 20 β , 21-tétrol 3-one (20 β -DHF)	Bismuthate CrO_3	Adrénostérone	Hexane-benzène (1-1) propenediol	4 h	Positive	Positive
		11 β -OH-androsténone	Hexane-benzène (1-1) propenediol	4 h	Positive	Positive
		Adrénostérone	Hexane-benzène (1-1)/propenediol	4 h	Positive	Positive
Cortisol (F)	Bismuthate CrO_3	Adrénostérone	Hexane-benzène (1-1)/propenediol	4 h	Positive	Positive
		Adrénostérone	Hexane-benzène (1-1)/propenediol	4 h	Positive	Positive
		Adrénostérone	Hexane-benzène (1-1)/propenediol	4 h	Positive	Positive
Cortisone (E)	Bismuthate CrO_3	Lactone 20 $\rightarrow$ 18 de l'acide 11 β -hydroxy 3-céto 18-oxo Δ_4 étiocolénique	Cyclohexane-benzène (1-1)/formamide	5 h	Négative	Positive
		5 β androstane 3 α , 11 β -diol 17-one (11 β -OH-étiocolanolone)	Hexane-benzène (1-1)/propenediol	8 h	Positive	Négative
		5 α -androstane 3 α , 11 β -diol 17-one (11 β -OH anurostane)	Hexane-benzène (1-1)/propenediol	8 h	Positive	Négative
Tétrahydrocortisol (THF)	Bismuthate	5 β -androstane 3 α -ol 11, 17-dione (11-céto-étiocolanolone)	Hexane-benzène (1-1)/propenediol	8 h	Positive	Négative
		5 β -androstane 3 α -ol 17-one (étiocolanolone)	Ligroïne/propenediol	10 h	Positive	Négative
		Lactone 20 $\rightarrow$ 18 de l'acide 18 hydroxy 3, 11-dione Δ_4 étiocolénique	Hexane-benzène (1-1)/propenediol	4 h	Négative	Positive
18 hydroxy 11-dehydrocortisostérone	IO_4H	Lactone 20 $\rightarrow$ 18 de l'acide 18 hydroxy 3-one Δ_4 étiocolénique	Isocotane/méthanol-eau (5/3-2)	6 h	Négative	Positive

2). *Oxydation de la fonction alcoolique en C₁₁ en fonction cétonique des dérivés mono- ou diacétylés des corticostéroïdes, au moyen d'oxyde chromique*

Après acétylation des corticostéroïdes contenant une fonction alcool en C₁₁, leurs acétates sont oxydés par l'oxyde chromique, selon la méthode indiquée au paragraphe précédent, et leurs dérivés cétoniques correspondants sont chromatographiés dans les systèmes indiqués dans le *tableau XI* avec leur mode de détection.

VIII. — MICROMÉTHODES D'ANALYSE QUANTITATIVE DES CORTICOSTÉROÏDES

Les corticostéroïdes isolés et identifiés après élution du chromatogramme et purification sur gel de silice sont évalués quantitativement par les microdosages suivants :

1) *Microdosage au bleu de tétrazolium*

L'extrait est dissous dans 1 ml d'éthanol ; on ajoute 0,1 ml d'une solution à 1 % (v/v) de tétraméthyl-ammonium dans l'éthanol à 90 % et 0,1 ml d'une solution de 50 mg de bleu de tétrazolium dans 10 ml d'éthanol.

On laisse reposer 30 minutes à la température ambiante et on ajoute 0,25 ml d'acide acétique glacial. La densité optique est mesurée à 505 m μ . On fait une courbe d'étalonnage avec une gamme de 1 à 5 μ g de cortisone.

Cette réaction est caractéristique des corticostéroïdes ayant une chaîne latérale α -cétonique.

RÉACTION DE ZIMMERMANN : révélation de 17-cétostéroïdes sur le chromatogramme.
— Réactifs :

- a) solution d'hydroxyde de potassium : 20 g de HOK sont dissous dans 5 ml d'eau et complétés à 100 ml avec éthanol à 95 % ;
- b) solution de métadinitrobenène à 1 % p/v dans l'éthanol.

Le chromatogramme est plongé dans la solution a, l'excès de réactif est enlevé entre deux feuilles de papier. Le chromatogramme est ensuite plongé dans la solution b, séché entre deux feuilles de papier-filtre et chauffé à 40°C.

Les 17-cétostéroïdes donnent une tache bleu-violet ; sensibilité entre 3 et 5 μ g.

TABLEAU XI

*Systèmes chromatographiques utilisés pour le produit d'oxydation chromique
des acétates de corticostéroïdes hydroxyles en C₁₁*

Acétate de corticostéroïdes	Produit d'oxydation (CrO ₃)	Système chromatographique (produit d'oxydation)	Révélation	
			Bleu de tétrazolum (BT)	Fluorescence en milieu sodique
Mono-acétate de cortisol (F)	Mono-acétate de cortisone (E)	Toluène/propanediol (5h)	Positive	Positive
Mono-acétate de corticostérone (B)	Mono-acétate de 11-déhydrocorticostérone (A)	Toluène/propanediol (5h)	Positive	Positive
Diacétate de tétrahydrocortisol (THF)	Diacétate de tétrahydrocortisone (THE)	Cyclohexane-benzène (1-1)/propanediol (6 h)	Positive	Négative
Diacétate d'allo-tétrahydrocortisol (allo-THF)	Diacétate d'allo-tétrahydrocortisone (allo-THE)	Cyclohexane-benzène (1-1)/propanediol (6 h)	Positive	Négative
Diacétate de tétrahydrocorticostérone (THB)	Diacétate de tétrahydro-11- déhydrocorticostérone (THA)	Méthylcyclohexane/ propanediol (5 h)	Positive	Négative
Diacétate d'allo-tétra- hydrocorticostérone (allo-THB)	Diacétate d'allo-tétrahydro-11- déhydrocorticostérone (allo-THA)	Méthylcyclohexane/ propanediol (5 h)	Positive	Négative

2) *Microdosage de Porter et Silber* [27]

L'extrait est dissous dans 1 ml d'une solution de phénylhydrazine (65 mg de phénylhydrazine dans une solution d'acide sulfurique à 62 % [v + v]).

On porte à 60°C pendant 30 minutes et, après refroidissement, on mesure la densité optique à 410 m μ et on retranche la densité optique d'un témoin obtenu en traitant la même quantité d'extrait avec l'acide sulfurique à 60 % v/v.

Une gamme est faite parallèlement en utilisant 2 à 6 μ g de cortisone.

Cette réaction est caractéristique de 17,21-dihydroxy 20-cétostéroïdes.

3) *Microdosage des stéroïdes formaldéhydogènes (selon Bongiovanni et Eberlein* [28])

L'extrait est dissous dans 0,1 ml d'acide acétique glacial et 0,4 ml d'une solution de periodate de potassium 0,001 M dans H₂SO₄ 0,3 N.

On laisse reposer pendant 45 minutes; l'excès d'oxydant est détruit par 0,1 ml d'une solution à 10 % de métabisulfite de sodium et on ajoute 1 ml d'un réactif à l'acide chromotrope: on dissout dans 4 ml d'eau 500 mg d'acide chromotrope (3,6-disulfonate de 1,8-dihydroxynaphtalène) et on amène à 10 ml par addition de H₂SO₄ concentré.

Les tubes sont mis au bain-marie pendant 30 minutes et on mesure la densité optique à 560 m μ .

Un étalonnage est fait parallèlement avec de la cortisone (1 à 5 μ g) utilisée comme standard de référence.

IX. — SPECTROPHOTOMÉTRIE DES CORTICOSTÉROÏDES

On fait les spectres des corticostéroïdes purifiés dans le visible, l'ultra-violet et l'infra-rouge.

1) *Absorption en milieu sulfurique* [19]

15-25 μ g du corticostéroïde sont dissous dans 3 ml de H₂SO₄ concentré. On laisse reposer 1 h à température ambiante et on étudie le spectre d'absorption entre 220 et 600 m μ .

2) Absorption en milieu éthanolique

15-25 μg du corticostéroïde sont dissous dans 3 ml d'éthanol et le spectre est étudié entre 220 et 500 $\text{m}\mu$.

Les corticostéroïdes ayant une fonction Δ_4 3-CO ont un maximum d'absorption entre 238 et 242 $\text{m}\mu$.

A partir du coefficient d'extinction moléculaire (ϵ), on peut évaluer la quantité du corticostéroïde présent en appliquant la formule :

$$C = \frac{\text{D.O.} \times \text{P.M.}}{\epsilon}$$

ou :

C	=	concentration en g %
D.O.	=	densité optique au maximum d'absorption
P.M.	=	poids moléculaire
ϵ	=	coefficient d'extinction moléculaire

3) Absorption dans H_3PO_4 à 100 % (méthode de Nowaczynski et Steyermark [29])

15-25 μg du corticostéroïde sont dissous dans 3 ml de H_3PO_4 à 100 % préparé par dissolution de 79 g de pentoxide de phosphore dans 59 ml d'acide phosphorique à 85 %. L'absorption est mesurée entre 220 et 600 $\text{m}\mu$.

4) Absorption en milieu acide sulfurique-éthanol (2/1-v/v) [30]

15-25 μg du stéroïde sont dissous dans 3 ml du réactif de OERTEL ; on laisse reposer 15 minutes à température ambiante et le spectre d'absorption est mesuré entre 300 et 500 $\text{m}\mu$.

Les stéroïdes ayant une fonction Δ_5 3 β -OH ont un maximum d'absorption à 402-405 $\text{m}\mu$.

5) Absorption dans l'infra-rouge

100-200 μg du stéroïde purifié sont mélangés avec 80 mg de KBr et comprimés dans une micro-matrice. Le spectre est enregistré dans un spectrophotomètre PERKIN-ELMER, modèle 13, entre 500 et 3 500 cm^{-1} de fréquence, en utilisant un prisme en CINa .

BIBLIOGRAPHIE

1. EDWARDS (R.W.H.), KELLIE (A.E.) et WADE (A.P.). — *Mem. Soc. Endocrinol.*, 1953, **2**, 53.
2. CRÉPY (O.), JAYLE (M.F.) et MESLIN (F.). — *Acta Endocrinol.*, 1957, **24**, 233.
3. BARLOW (J.J.). — *Biochem. J.*, 1957, **65**, 34.
4. BROCKMANN (H.) et SCHODDER. — *Ber. Deut. Chem. Ges.*, 1941, **74**, 73.
5. VLITOS (A.J.). — *Contr. Boyce Thompson Inst.*, 1953, **17**, 127.
6. ROY (A.B.). — *Biochem. J.*, 1956, **62**, 41.
7. CRÉPY (O.) et RULLEAU-MESLIN (F.). — *Rev. Franç. Et. Clin. Biol.*, 1960, **5**, 283.
8. TOLLENS (B.). — *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, 1908, **41**, 1788.
9. JAYLE (M.F.) et CRÉPY (O.). — *Ann. Biol. Clin.*, 1954, **12**, 108.
10. JARRIGE (P.) et LAFOSCADE (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1959, **41**, 1197.
11. ALFSEN (A.). — *C.R. Acad. Sciences (Paris)*, 1957, **244**, 251.
12. FISHMAN (W.H.), SPRINGER (B.), BRUNETTI (R.). — *J. Biol. Chem.*, 1948, **173**, 449.
13. COHEN (S.L.) et ONESON (I.B.). — *J. Biol. Chem.*, 1953, **204**, 245.
14. SCHNEIDER (J.J.) et LEWBART (M.J.). — *J. Biol. Chem.*, 1956, **222**, 787.
15. BURTON (R.B.), ZAFFARONI (A.) et KEUTMANN (E.H.). — *J. Biol. Chem.*, 1951, **188**, 763.
16. BUSH (I.E.). — *Biochem. J.*, 1952, **50**, 370.
17. ZAFFARONI (A.) et BURTON (R.B.). — *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 749.
18. EBERLEIN (W.R.) et BONGIOVANNI (A.M.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1955, **59**, 90.
19. ZAFFARONI (A.). — *Rec. Prog. Hormon Research*, 1953, **8**, 51.
20. HAINES (W.J.) et DRAKE (N.A.). — *Federation Proc.*, 1950, **9**, 180.
21. CHEN (C.) and TEWELL (H.E.). — *Federation Proc.*, 1951, **10**, 377.
22. MADER (W.J.) et BUCK (R.R.). — *Anal. Chem.*, 1952, **24**, 666.
23. NEHER (R.) et WETTSTEIN (A.). — *Helv. Chim. Acta*, 1951, **34**, 2278.

24. CRÉPY (O.) et JUDAS (O.). — *Rev. Franç. Et. Clin. Biol.*, 1960, **5**, 284.
 25. BURMA (D.P.). — *Anal. Chim. Acta*, 1953, **9**, 513.
 26. NORYMBERSKI (J.K.) et STUBBS (R.D.). — *Biochem. J.*, 1956, **64**, 168.
 27. PORTER (C.C.) et SILBER (R.H.). — *J. Biol. Chem.*, 1950, **185**, 201.
 28. BONGIOVANNI (A.M.) et EBERLEIN (W.R.). — *J. Lab. Clin. Med.*, 1956, **48**, 320.
 29. NOWACZYNSKI (W.J.) and STEYERMARK (P.R.). — *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 1956, **34**, 592.
 30. OERTEL (G.W.) et EIK-NES (K.B.). — *Anal. Chem.*, 1959, **31**, 98.
-

Répartition des corticostéroïdes urinaires entre les fractions libre, ester-sulfate et glucosiduronate, après administration d'ACTH

Dans la première partie de nos recherches, nous avons eu comme objectif d'étudier la répartition du cortisol (F), de la corticostérone (B), de la cortisone (E) et de la 11-déhydrocorticostérone (A), ainsi que celle de leurs métabolites di- et tétrahydrogénés entre les fractions libres ester-sulfate et glucosiduronate séparées par chromatographie sur alumine. Les métabolites hexahydrogénés n'ont pas été étudiés dans ce travail.

Les résultats obtenus permettent d'avoir une vue générale sur le métabolisme du cortisol et de la corticostérone chez l'homme et d'apprécier l'influence de la structure des corticostéroïdes sur leurs modes de conjugaison.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) *Matériel biologique*

On a recueilli 5 litres d'urine de sujets qui avaient reçu 80 U.I. du complexe corticotropine-phosphate de zinc, en deux injections intramusculaires pratiquées à douze heures d'intervalle.

On recueille les urines des vingt-quatre heures suivant la deuxième injection.

2) *Extraction des corticostéroïdes urinaires*

Les corticostéroïdes libres et conjugués sont extraits par la méthode d'EDWARDS et coll. (page 24).

L'extrait sec est dissous dans 100 ml d'eau et les corticostéroïdes libres sont extraits 3 fois par 1 v de dichlorométhane (fraction I).

3) *Fractionnement des corticostéroïdes conjugués sur colonne d'alumine*

Les corticostéroïdes conjugués sont séparés sur colonne d'alumine type BROKMANN II-III, en ester-sulfates et glucosiduronates.

La *figure 2* montre la séparation sur colonne d'alumine des différents conjugués et la *figure 3* montre les résultats du dosage des ester-sulfates par réaction de VLITOS (page 26) et des glucosiduronates par la réaction de TOLLENS (page 27).

La *figure 3* indique une nette séparation de la fraction ester-sulfate des glucosiduronates ; cependant, dans les premiers éluats des glucosiduronates, il existe une petite fraction d'ester-sulfates que nous dénommons ester-sulfates II ou sulfates polaires.

Cette fraction a été séparée des glucosiduronates qui l'accompagnaient. Elle contient un sulfate de corticostéroïde qui a donné lieu à une étude approfondie en vue de son identification (page 88).

4) *Hydrolyse des corticostéroïdes conjugués*

Les ester-sulfates et les glucosiduronates ont été respectivement hydrolysés par des préparations purifiées de sulfatase et de β -glucuronidase du suc digestif d'*Helix pomatia* (page 27).

5) *Purification des corticostéroïdes*

Les corticostéroïdes de la fraction libre et les corticostéroïdes obtenus par hydrolyse des ester-sulfates et glucosiduronates ont été purifiés sur colonne de florisil activé (page 28).

6) *Chromatographie sur papier des corticostéroïdes*

Afin d'isoler les différents corticostéroïdes contenus dans les fractions libre (I), sulfoconjuguée (II) et glucuroconjuguée (III), nous leur avons appliqué le protocole décrit page 29.

Les corticostéroïdes ont été séparés en trois fractions de polarité décroissante, dans le système chloroforme-formamide, en trois heures, à $24^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Le chromatogramme est divisé en trois fractions :

- fraction I (la plus polaire) : de l'origine à 14 cm ;
- fraction II (moyennement polaire) : de 14 à 24 cm ;
- fraction III (peu polaire) : de 24 cm jusqu'au front du solvant.

Le système général de la chromatographie sur papier est indiqué dans la *figure 4*.

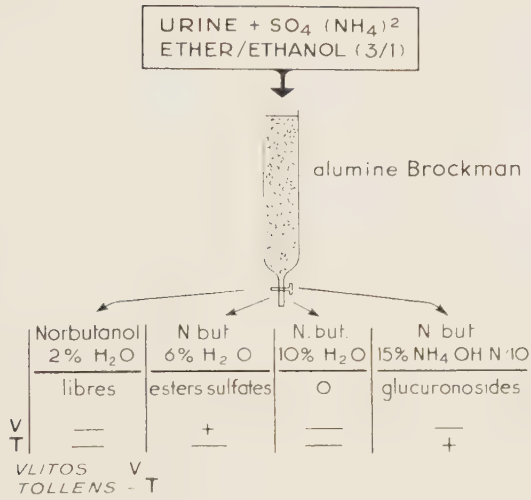


FIGURE 2

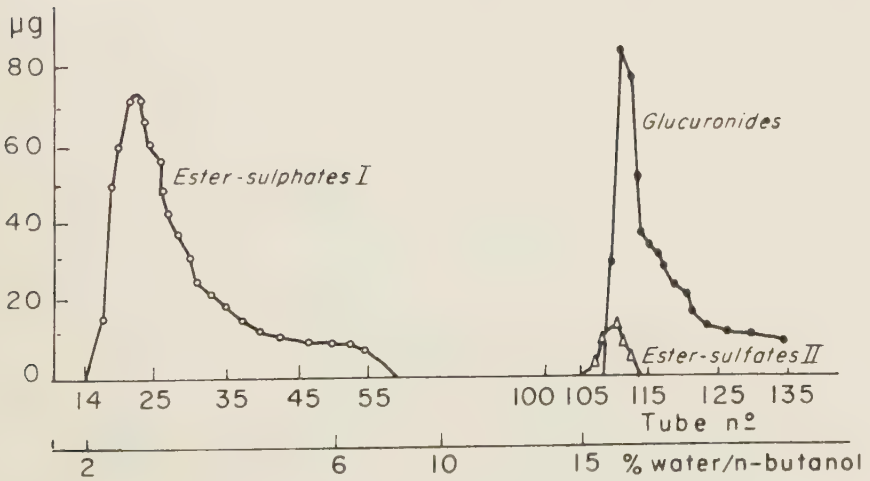
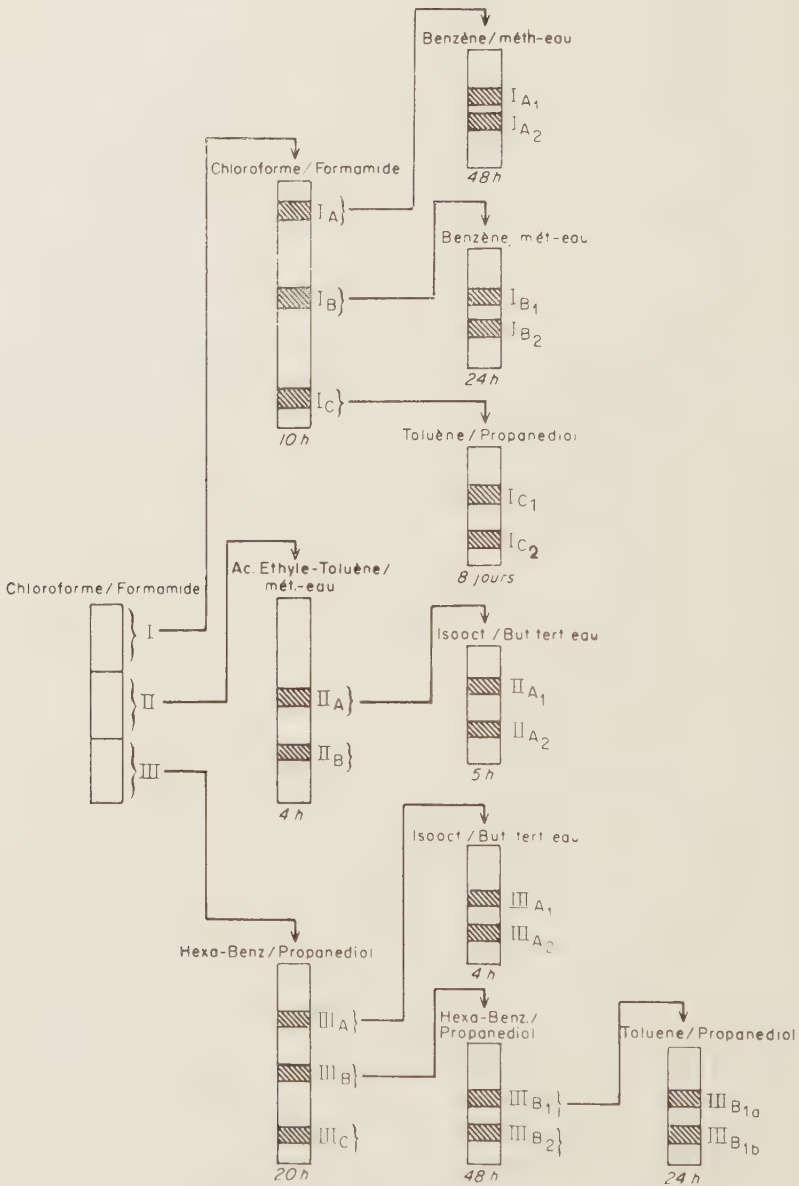


FIGURE 3 : Séparation chromatographique sur colonne d'alumine des ester-sulfates et glucuronosides de cortico-stéroïdes urinaires

FIGURE 4

Schéma du fractionnement chromatographique sur papier des corticostéroïdes



7) *Purification des stéroïdes après élution du chromatogramme*

Les stéroïdes provenant de la chromatographie sur papier ont été purifiés par chromatographie d'adsorption sur gel de silice avant et après acétylation, afin d'éliminer les impuretés et de réaliser l'étude par les microméthodes chimiques et spectrophotométriques et l'analyse quantitative (page 34).

II. — IDENTIFICATION DES DIFFÉRENTS CORTICOSTÉROÏDES

Nous n'avons étudié que les corticostéroïdes biologiquement actifs et leurs métabolites di- et tétrahydrogénés, à l'exclusion des corticostéroïdes hexahydrogénés.

Les stéroïdes contenus dans chaque fraction ont été identifiés par chromatographie dans différents systèmes de partage et par l'application de micro-réactions spécifiques.

Nous étudierons successivement les stéroïdes de chaque fraction par ordre de polarité croissante.

1) *Fraction la plus polaire (I)*

SOUS-FRACTION I_A

Cette fraction a été séparée en deux composants I_{A1} et I_{A2}. Le tableau XII indique leurs R_t* dans deux systèmes chromatographiques différents.

TABLEAU XII

R_t des stéroïdes I_{A1} et I_{A2} dans deux systèmes chromatographiques différents

Stéroïdes	Chloroforme/formamide (10 h)		Benzène/méthanol-eau (2/1-1)(48 h)	
	R _{20α} -DHF*	R _{20β} -DHF	R _{20α} -DHF	R _{20β} -DHF
I _{A1}	I	0.70	1.04	0.97
I _{A2}	1.42	1	1.25	1

(*) R_t : vitesse de migration du stéroïde isolé par rapport à la vitesse de migration du standard de référence.

(**) Nous remercions le Docteur D. FUKUSHIMA de nous avoir procuré le prégn-4-ène 11β, 17α, 20α, 21-tétrol 3-one (20α-DHF) et le prégn-4-ène 11β, 17α, 20β, 21-tétrol 3-one (20β-DHF).

Après purification, une partie aliquote des fractions I_{A1} et I_{A2} a été oxydée par le bismuthate de sodium et par l'oxyde chromique (page 35). Les R_f de leurs produits d'oxydation sont indiqués dans le *tableau XIII*.

TABLEAU XIII : R_f des stéroïdes obtenus après oxydation des corticostéroïdes I_{A1} et I_{A2} dans le système hexane-benzène (1-1)/propanediol (4 b)

Stéroïdes	Mode d'oxydation	$R_{adrénostérone}$	$R_{11\beta\text{-androsténedione}}$
I_{A1}	Bismuthate	0.40	1
	Oxyde chromique	1	2.45
I_{A2}	Bismuthate	0.41	1
	Oxyde chromique	1	2.48

Après acétylation, les acétates ont été chromatographiés dans le système toluène/propanediol; les résultats sont indiqués dans le *tableau XIV*.

TABLEAU XIV
 R_f des acétates de stéroïdes I_{A1} dans le système toluène/propanediol (5 b)

Stéroïdes	$R_{20,21\text{-diacétate de } 20\alpha\text{-DHF}}$	$R_{20,21\text{-diacétate de } 20\beta\text{-DHF}}$
I_{A1}	1	1.86
I_{A1}	0.53	1

Les différentes réactions de caractérisation des stéroïdes I_{A1} et I_{A2} sont identiques dans le *tableau XV*.

TABEAU XV : Réactions de caractérisation des stéroïdes I_{A1} et I_{A2}
et des corticostéroïdes de référence

REACTIONS DE CARACTERISATION	I_{A1}	20 α -DHF	I_{A2}	20 β -DHF
Absorption à $\mu\mu$ 254 (caractéristique de la fonction Δ_4 3-CO)	Positive	Positive	Positive	Positive
Fluorescence en milieu sodique (lumière de Wood)	Positive	Positive	Positive	Positive
Réaction au bleu de tétrazolium	Négative	Négative	Négative	Négative
Formation de 17-cétostéroïdes par oxydation	Positive	Positive	Positive	Positive
Réaction de Zimmermann	Négative	Négative	Négative	Négative
Maximum d'absorption en milieu éthanolique (en $\mu\mu$) $\left[\begin{array}{c} 1 \% \text{ mg/ml} \\ E \\ 1 \text{ cm} \end{array} \right]$	241	240	240	240
Maximum d'absorption dans H_2SO_4 concentré (en $\mu\mu$) $\left[\begin{array}{c} 1 \% \text{ mg/ml} \\ E \\ 1 \text{ cm} \end{array} \right]$	238-284 400-450	240-283 330-452	237-282 400-460	238-285 336-405 460

Spectre infra-rouge de l'acétate du stéroïde I_{A1} :

Le spectre infra-rouge de l'acétate du stéroïde I_{A1} fait sur 100 μg dans le spectrophotomètre PERKIN-ELMER (modèle 13) dans une pastille de KBr, présente les mêmes bandes d'absorption que le 20, 21-diacétate de préjna 4-ène 11 β , 17 α , 20 α , 21-tétrol 3-one de synthèse, dans la région du spectre comprise entre 700 et 1 900 cm^{-1} .

Les bandes caractéristiques des acétates en C_{21} et C_{20} se situent à 1 740-1 720 cm^{-1} , celle de la fonction Δ_4 3-CO à 1 670-1 680 cm^{-1} et la bande du 20, 21-diacétate à 1 230-1 250 cm^{-1} .

De l'ensemble de ces données, nous pouvons conclure que le stéroïde I_{A1} est le préjna 4-ène 11 β , 17 α , 20 α , 21-tétrol 3-one et que le stéroïde I_{A2} est le préjna 4-ène 11 β , 17 α , 20 β , 21-tétrol 3-one.

Evaluation quantitative :

L'évaluation quantitative des stéroïdes I_{A1} et I_{A2} a été faite à partir du coefficient d'extinction moléculaire (ϵ) des Δ_4 3-cétostéroïdes en appliquant la formule de la page 40.

SOUS-FRACTIONS I_B ET I_C

Les deux stéroïdes composant la fraction I_B (I_{B1} et I_{B2}) et les deux stéroïdes composant la fraction I_C (I_{C1} et I_{C2}) ont été chromatographiés dans trois systèmes différents.

Le *tableau XVI* indique les R_f de chacun de ces quatre stéroïdes dans trois différents systèmes. Après oxydation par le bismuthate de sodium (page 35), les produits d'oxydation de ces quatre stéroïdes ont été chromatographiés ; les résultats sont indiqués dans le *tableau XVI*, ainsi que leurs modes de détection.

Chromatographie des acétates :

Après acétylation, les stéroïdes ont été chromatographiés et les résultats sont indiqués dans le *tableau XVIII*.

Les acétates des différents stéroïdes ont été oxydés par l'oxyde chromique et leurs produits d'oxydation ont été chromatographiés. Les résultats sont indiqués dans le *tableau XIX*.

Réactions de caractérisation :

Les différentes réactions utilisées pour caractériser ces quatre stéroïdes sont indiquées dans le *tableau XX*.

De l'ensemble de ces résultats, on peut tirer les conclusions suivantes sur l'identification de ces quatre stéroïdes :

- le stéroïde I_{B1} est le 5 β -prégnane 3 α , 11 β , 17 α , 21-tétrol 20-one (THF) ;
- le stéroïde I_{B2} est le 5 α -prégnane 3 α , 11 β , 17 α , 21-tétrol 20-one (allo-THF) ;
- le stéroïde I_{C1} est le 5 β -prégnane 3 α , 17 α , 21-triol 11, 20-dione (THE) ;
- le stéroïde I_{C2} est le préгна-4-ène 11 β , 17 α , 21-triol 3-20-dione (F).

TABLEAU XVI

R des stéroïdes *I*_m, *I*₁₂, *I*₁₃, *I*₁₄ dans trois systèmes chromatographiques

Stéroïdes	SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES											
	Chloroforme/formamide (10h)				Toluène/propanediol (168h)				Benzène/méthanol-eau (2/1-1) (15h)			
	R _{THF}	R _{allo-THF}	R _{THE}	R _F	R _{THF}	R _{allo-THF}	R _{THE}	R _F	R _{THF}	R _{allo-THF}	R _{THE}	R _F
<i>I</i> _{B1}	1,02	0,85	0,30	0,30	1,05	0,79	0,65	0,34	1	0,83	0,53	0,43
<i>I</i> _{B2}	1,15	0,98	0,35	0,35	1,33	1	0,82	0,42	1,20	1	0,64	0,52
<i>I</i> _{C1}	3,3	2,87	1	1	1,54	1,16	0,95	0,49	1,94	1,62	1,03	0,83
<i>I</i> _{C2}	3,3	2,87	1	1	3,14	2,36	1,94	1	2,33	1,94	1,27	1

TABLEAU XVII

R: des stéroïdes obtenus après oxydation des corticostéroïdes I_{B1} , I_{B2} , I_{C1} , I_{C2}
dans le système hexane-benzène (1-1)/propanediol et leurs modes de révélation

Stéroïdes oxydés	Système: Hexane-benzène (1-1)/propanediol				Mode de révélation			
	$R_{11\beta-OH-étiocholanolone}$	$R_{11\beta-OH-androstérone}$	$R_{11-céto-étiocholanolone}$	$R_{Adrénostérone}$	Stéroïdes oxydés et leur standard de référence	Zimmermann	Absorption à 254 m μ	Fluorescence en milieu sodique
I_{B1}	1.09	0.65	0.26	-	I_{B1} oxydé $11\beta-OH-étiocholanolone$	Positive	Négative	Négative
I_{B2}	1.70	1.05	0.50	-	I_{B2} oxydé $11\beta-OH-androstérone$	Positive	Négative	Négative
I_{C1}	3.68	2.53	0.96	-	I_{C1} oxydé $11-céto-étiocholanolone$	Positive	Négative	Négative
I_{C1}	-	-	-	1	I_{C2} oxydé Adrénostérone	Positive	Positive	Positive
						Positive	Positive	Positive

TABLEAU XVIII

R₁ des acétates de stéroïdes des fractions I_B et I_C dans deux systèmes chromatographiques différents et leurs modes de révélation

Acétates de stéroïdes	SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES				MODES DE REVELATION			
	Cyclohexane-benzène (1-1)/formamide		Toluène/propanediol		Stéroïdes oxydés et leur standard de référence	Bleu de tétrazolum.	Absorption à 254 mμ	Fluorescence en milieu sodique
	R _{3,21} -diac-THF	R _{3,21} -diac-allo-THF	R _{3,21} -diac-THF	R _{3,21} -diac-THF				
Ac.I _{B1}	1	1.02	0.57	-	Ac.I _{B1} 3,21-diac-THF	Positive	Négative	Négative
Ac.I _{B2}	0.95	0.97	0.60	-	Ac.I _{B2} 3,21-diac-allo-THF	Positive	Négative	Négative
Ac.I _{C1}	1.57	1.62	1	-	Ac.I _{C1} 3,21-diac-THF	Positive	Négative	Négative
Ac.I _{C2}	-	-	-	1	Ac.I _{C2} 21-ac-F	Positive	Positive	Positive

TABLEAU XIX

*R*¹ des produits d'oxydation chromatique de différents acétates de stéroïdes acétates de stéroïdes *I*_B et *I*_C

Acétates de stéroïdes après oxydation chromique	SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES				
	Cyclohexane-benzène (1-1)/formamide		Toluène/propanediol		
	R _{3,21} -diac.THF	R _{3,21} -diac.allo-THF	R _{3,21} -diac.THF	R ₂₁ -acétate F	R ₂₁ -acétate E
Ac.I _B ₁	0.57	0.58	1	-	-
Ac.I _B ₂	0.52	0.53	0.93	-	-
Ac.I _C ₁	0.57	0.58	1	-	-
Ac.I _C ₂	-	-	-	2,10	1

TABLEAU XX

Réactions de caractérisation des corticostéroïdes I_{B1} , I_{B2} , I_{C1} , I_{C2} et de corticostéroïdes de référence

REACTIONS DE CARACTÉRISATION	I_{B1}	THF	I_{B2}	allo-THF	I_{C1}	THE	I_{C2}	F
Bleu de tétrazolium	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
Réaction de Porter-Silber	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
Réaction Zimmermann	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative
Absorption à 254 m μ	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Positive	Positive
Fluorescence en milieu sodique	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative	Positive	Positive
Maximum d'absorption dans l'acide sulfurique concentré (en m μ)	265-330 420-510	262-330 415-505	260-330 420-510	263-332 420-510	265-330 405	265-330 408	240-282 390-475	237-282 393-475
$\left. \begin{array}{l} \text{E} \\ \text{1 cm} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{1 \% mg/ml} \\ \text{1 cm} \end{array}$								

2) Fraction moyennement polaire (II)

SOUS-FRACTION II_A

Cette sous-fraction contient deux stéroïdes (II_{A1} et II_{A2}) le stéroïde II_{A1} a été identifié avec l'aldostérone et le stéroïde II_{A2} a fait l'objet d'une étude particulière qui sera décrite au chapitre V, p. 115.

SOUS-FRACTION II_B

Ce stéroïde a été chromatographié dans les systèmes indiqués dans le tableau XXI.

TABLEAU XXI

R_f du stéroïde II_B dans trois systèmes chromatographiques différents

Stéroïde	SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES		
	Chloroforme/formamide R _E	Toluène-acétate d'éthyle/ méthanol-eau (9-1/5-5) R _E	Toluène/propanediol R _E
II _B	1	0.98	1.05

Après oxydation par le trioxyde de chrome ou par le bismuthate, le produit d'oxydation a le même R_f que l'adrénostérone chromatographié en parallèle dans le système cyclohexane-benzène (1-1)/propanediol.

L'acétate du stéroïde II_B a la même migration et les mêmes caractères physico-chimiques que l'acétate de cortisone.

Réaction de caractérisation :

Elles sont indiquées dans le tableau XXII.

L'ensemble de ces données permet d'identifier le stéroïde II_B avec le prégn-4-ène, 17 α , 21-diol 3, 11, 20-trione (cortisone).

3) Fraction peu polaire (III)

SOUS-FRACTION III_A

Cette sous-fraction contient deux stéroïdes (III_{A1} et III_{A2}) qui ont été chromatographiés dans les systèmes indiqués dans le tableau XXIII (page 58).

TABLEAU XXII : Réactions de caractérisation du stéroïde II_B
et du corticostéroïde de référence

Réactions de caractérisation	II _B	Cortisone (E)
Absorption à 254 mμ	Positive	Positive
Fluorescence en milieu sodique (lumière de Wood)	Positive	Positive
Réaction au bleu de tétrazolium (BT)	Positive	Positive
Réaction de Porter et Silber	Positive	Positive
Maximum d'absorption en solution éthanolique (mμ) $\left[\begin{array}{l} 1 \% \text{ mg/ml} \\ \text{E} \\ 1 \text{ cm} \end{array} \right]$	240	240
Maximum d'absorption dans l'acide sulfurique concentré (mμ) $\left[\begin{array}{l} 1 \% \text{ mg/ml} \\ \text{E} \\ 1 \text{ cm} \end{array} \right]$	282 - 345 - 410	283 - 342 - 413 - 480

Le stéroïde III_{A2} a été oxydé par le bismuthate de sodium et son produit d'oxydation a la même R_f que l'étiocholanolone dans le système ligroïne/propanediol.

Réactions de caractérisation :

Les propriétés physico-chimiques des stéroïdes III_{A1} et III_{A2} sont indiquées dans le *tableau XXV*.

En conclusion, le stéroïde III_{A1} est identifié avec la tétrahydro-corticostérone (THB) et le III_{A2} avec la tétrahydro 17α-hydroxy-cortexone (THS).

SOUS-FRACTION III_B

Cette sous-fraction contient deux sous-fractions : III_{B1} et III_{B2}

SOUS-FRACTION III_{B1}

Elle est composée de deux stéroïdes III_{B1a} et III_{B1b} qui ont été chromatographiés dans différents systèmes.

Les résultats sont indiqués dans le *tableau XXVI* (page 59).

Après acétylation, leurs acétates ont été chromatographiés et les résultats sont indiqués dans le *tableau XXVII* (page 60).

SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES

SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES							
	Isooctane/butanol tertiaire-eau		Toluène/propenediol		Benzène/formamide		Isooctane-toluène/ méthanol-eau (5-5)/(7-3)
	R _{THS}	R _{THB}	R _{THS}	R _{THB}	R _{THS}	R _{THB}	
STEROIDE							
III _A ₁	0.74	I	1.61	1	1.20	1	0.98
III _A ₂	1	1.40	1.05	0.62	1	0.83	1.30

BLEAU XXIII (ci-dessus) : R_i des stéroïdes III_{A1} et III_{A2} sur différents systèmes chromatographiques

ata: les chiffres du système Benzène/formamide sont inversés.

BLEAU XXV (ci-contre) : R₁ des acétates des stéroïdes III_{A1}
III_{A2} dans deux systèmes chromatographiques

SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES			
STEROIDE	Méthylcyclohexane/propanediol		Ligroïne/propanediol
	R _{diac.} THS	R _{diac.} THB	R _{diac.} THS R _{diac.} THB
Ac. III A ₁	0.73	i	0.8 i
Ac. III A ₂	1.08	1.30	i 1.25

TABLEAU XXV

*Réactions caractéristiques des stéroïdes III_{A1} et III_{A2}
et des corticostéroïdes de référence*

REACTIONS DE CARACTERISATION	STEROIDES			
	III _{A1}	THB	III _{A2}	THS
Réaction au bleu de tétrazolium	Positive	Positive	Positive	Positive
Fluorescence en milieu sodique (lumière de Wood)	Négative	Négative	Négative	Négative
Fluorescence à l'acide phosphorique à 15 %	Vert-jaune	Vert-jaune	Rose	Rose
Absorption à 254 mμ	Négative	Négative	Négative	Négative
Réaction Zimmermann	Négative	Négative	Négative	Négative
Réaction Porter et Silber	Négative	Négative	Positive	Positive
Maximum d'absorption dans l'acide sulfurique concentré mμ $\left[\begin{array}{l} 1 \% \text{ mg/ml} \\ E \\ 1 \text{ cm} \end{array} \right]$	310 - 412	310 - 415	315 - 405	315 - 410

TABLEAU XXVI

*R_e des stéroïdes III_{B1a} et III_{B1b}
dans trois systèmes chromatographiques différents*

Stéroïdes	SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES					
	Hexane-benzène(1-1)/propanediol		Benzène/formamide		Toluène/propanediol	
	R _{allo} -THB	R _{THA}	R _{allo} -THB	R _{THA}	R _{allo} -THB	R _{THA}
III _{B1a}	0.95	0.77	1	0.75	1	0.70
III _{B1b}	1.23	1	1.33	1	1.42	1

TABLEAU XXVII

*R_i des acétates des stéroïdes III_{B1a} et III_{B1b}
dans deux systèmes chromatographiques*

ACETATES STEROIDES	SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES			
	Méthylcyclohexane/propanediol		Ligroïne/propanediol	
	R _{diac.allo-THB}	R _{diac.THA}	R _{diac.allo-THB}	R _{diac.THA}
Ac.III _{B_{1a}}	1	0.48	1	0.40
Ac.III _{B_{1b}}	2.10	1	2.50	1

TABLEAU XXVIII

*Réactions de caractérisation des stéroïdes III_{B1a} et III_{B1b}
et des corticostéroïdes de référence*

Réactions de caractérisation	STEROIDES			
	III _{B_{1a}}	allo-THB	III _{B_{1b}}	THA
Réaction au bleu de tétrazolum	Positive	Positive	Positive	Positive
Réaction de Zimmermann	Négative	Négative	Négative	Négative
Fluorescence en milieu sodique (lumière de Wood)	Négative	Négative	Négative	Négative
Absorption à 254 mμ	Négative	Négative	Négative	Négative
Réaction de Porter et Silber	Négative	Négative	Négative	Négative
Maximum d'absorption dans l'acide sulfurique concentré (en mμ)	315-415	320-410	290-415	290-355-415
1 % mg/ml E 1 cm				

Les acétates des stéroïdes III_{B1a} et III_{B1b} ont été oxydés par le CrO₃, le produit d'oxydation du stéroïde B_{1a} a la même migration que le diacétate de l'allo-tétrahydro 11-déhydrocorticostérone (allo-THA) et le produit d'oxydation de l'acétate du stéroïde III_{B1b} a la même migration que le diacétate de tétrahydro 11-déhydrocorticostérone (THA), ce qui indique que ce dernier acétate n'a pas été modifié par l'oxydation chromique. Les propriétés physico-chimiques des stéroïdes III_{B1a} et III_{B1b} sont indiquées dans le *tableau XXVIII* (page 60).

En conclusion, le stéroïde III_{B1a} est identifié avec l'allo-tétrahydrocorticostérone (allo-THB) et le III_{B1b} avec le tétrahydro 11-déhydrocorticostérone (THA).

SOUS-FRACTION III_{B2}

Le stéroïde de cette fraction a été chromatographié dans les systèmes indiqués dans le *tableau XXIX*.

TABLEAU XXIX

R_f du stéroïde III_{B2} dans différents systèmes chromatographiques

Stéroïde	SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES				
	Chloroforme/ formamide	Isooctane-toluène/ méthanol-eau (2-3/3-2)	Toluène/ propanediol	Benzène/ formamide	Hexane-benzène (1-1)/propanediol
	R _B	R _B	R _B	R _B	R _B
III _{B2}	1	1	1.02	1	1

Dans tous les systèmes indiqués, le stéroïde III_{B2} avait la même migration que la corticostérone (R_B = 1).

Après oxydation par le bismuthate de sodium, le produit d'oxydation n'a pas présenté les caractéristiques d'un 17-cétostéroïde.

L'acétate du III_{B2} a été chromatographié dans les systèmes cyclohexane-benzène (1-1)/formamide et toluène/propanediol. Dans ces systèmes, il avait la même migration et les mêmes caractéristiques que le monoacétate de corticostérone (B).

Après oxydation de l'acétate, son produit d'oxydation avait la même migration que le monoacétate de 11-déhydrocorticostérone dans le système : cyclohexane-benzène (1-1)/formamide.

Propriétés physico-chimiques :

Les différentes réactions de caractérisation du stéroïde III_{B2} sont indiquées dans le *tableau XXXI*.

TABLEAU XXX

Réactions de caractérisation du stéroïde III_{B2} et du corticostéroïde de référence

Réactions de caractérisation	STEROÏDE III _{B2}	B (corticosterone)
Absorption à 254 mμ	Positive	Positive
Réaction au bleu de tétrazolium	Positive	Positive
Fluorescence en milieu sodique (lumière de Wood)	Positive	Positive
Maximum d'absorption en milieu éthanolique (en mμ)	241	240
$\left(\begin{array}{c} 1 \% \text{ mg/ml} \\ E \\ 1 \text{ cm} \end{array} \right)$		
Fluorescence à l'acide phosphorique à 15 %	Faible, jaune-verte	Faible, jaune-verte
Réaction de Porter et Silber	Négative	Négative
Réaction de Zimmermann	Négative	Négative
Maximum d'absorption dans l'acide sulfurique concentré (en mμ)	285-370-460	284-320-375-455
$\left(\begin{array}{c} 1 \% \text{ mg/ml} \\ E \\ 1 \text{ cm} \end{array} \right)$		

On peut conclure à partir de ces données à l'identité du stéroïde III_{B2} avec la corticostérone (B).

SOUS-FRACTION III_C

Le stéroïde III_C a été chromatographié dans différents systèmes et les résultats sont indiqués dans le *tableau XXXI*.

Dans les différents systèmes indiqués ci-dessus, le stéroïde III_C avait les mêmes migrations que la 11-déhydrocorticostérone.

Son acétate avait la même migration que le monoacétate de 11-déhydrocorticostérone dans le système hexane-benzène (1-1)/formamide.

Après oxydation chromique, le produit d'oxydation avait les mêmes caractéristiques que l'acétate de 11-déhydrocorticostérone.

TABLEAU XXXI

R_f du stéroïde III_c dans différents systèmes chromatographiques

STEROÏDE	SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES			
	Chloroforme/formamide	Toluène/propanediol	Benzène/formamide	Isooctane/butanol tertiaire-eau (10/5-9) R _A
III _C	1	1	1	1

Propriétés physico-chimiques :

Les différentes réactions de caractérisation du stéroïde III_c sont indiquées dans le *tableau XXXII*.

TABLEAU XXXII

Réactions de caractérisation du stéroïde III_c et du stéroïde de référence

Réactions de caractérisation	III _C	11-déhydro- corticostérone
Réaction au bleu de tétrazolium	Positive	Positive
Réaction de Porter et Silber	Négative	Négative
Réaction de Zimmermann	Négative	Négative
Absorption à 254 mμ	Positive	Positive
Fluorescence en milieu sodique (lumière de Wood)	Positive	Positive
Maximum d'absorption en milieu éthanolique (en mμ) $\left. \begin{array}{l} 1 \% \text{ mg/ml} \\ \text{E} \\ 1 \text{ cm} \end{array} \right\}$	240	240
Maximum d'absorption en milieu sulfurique concentré (en mμ) $\left. \begin{array}{l} 1 \% \text{ mg/ml} \\ \text{E} \\ 1 \text{ cm} \end{array} \right\}$	285-350-412	284-355-410

L'ensemble de ces données permet d'identifier le stéroïde III_c avec la 11-déhydrocorticostérone (A).

III. — ÉVALUATION QUANTITATIVE DES DIFFÉRENTS STÉROÏDES

Après l'identification des différents corticostéroïdes de chaque fraction (libre I, sulfoconjuguée II et glucosiduronate III), nous avons procédé à l'étude quantitative en appliquant les semi-microréactions au bleu de tétrazolium, à la phénylhydrazine-sulfurique selon PORTER et SILBER, et par le dosage du formol dégagé après oxydation par le periodate (page 35).

Le *tableau XXXIII* indique les résultats des corticostéroïdes biologiquement actifs et le *tableau XXXIV*, ceux des métabolites di- et tétrahydrogénés.

DISCUSSION DES RESULTATS

Les résultats indiqués dans les *tableaux XXXIII* et *XXXIV* représentent la moyenne de quatre extraits urinaires différents, provenant de sujets ayant reçu de l'ACTH.

1) *Hormones stéroïdes corticosurrénales*

Cortisol (F), corticostérone (B), cortisone (E) et 11-déhydrocorticostérone (A).

Nous démontrons l'existence de corticostéroïdes ayant un groupement Δ_4 3-C=O dans la fraction ester-sulfate. Ils représentaient approximativement la moitié des corticostéroïdes sulfoconjugués alors que, dans la fraction glucosiduronate, ils n'excédaient pas 2 % environ des corticostéroïdes α -cétoïques.

La corticostérone et la 11-déhydrocorticostérone n'ont été identifiées que dans la fraction sulfoconjuguée. Il n'y avait que des traces de ces deux corticostéroïdes dans la fraction libre et nous n'avons pas réussi à les détecter dans les glucosiduronates.

Le cortisol et la cortisone se répartissent dans les trois fractions.

Dans des essais plus récents, après surcharge exogène de la corticostérone et du cortisol, nous avons trouvé des quantités très importantes de corticostéroïdes non transformés dans la fraction ester-sulfate. (Cette expérience nous a permis d'identifier le sulfate de corticostérone et le sulfate de cortisol dans l'urine humaine. Ces recherches sont décrites page 81).

TABLEAU XXXIII

Hormones corticosurrénales urinaires (après 80 U.I. d'ACTH-retard)

Hormones	FRACTION I	FRACTION II	FRACTION III
	libres µg o/oo	sulfoconjuguée µg o/oo	glucosiduronates µg o/oo
Cortisol	300	200	260
Cortisone	15	20	60
Corticostérone	traces	240	0
11-dehydrocorticostérone	traces	70	0
Total (µg o/oo)	315	530	320
% total général (I+II+III)	26	46	28

TABLEAU XXXIV

*Métabolites di- et tétrahydrogénés de corticostéroïdes,
après administration d'ACTH-retard (en µg‰ d'urine)*

Stéroïdes	FRACTION I libres	FRACTION II sulfoconjuguée	FRACTION III glucosiduronates
20α-DHF	55	65	Traces
20β-DHF	20	35	Traces
THF	300	125	6500
allo-THF	0	0	2000
THE	55	0	2500
THS	Traces	Traces	450
THB	100	100	800
allo-THB	0	0	3000
THA	Traces	260	450
Total général (I+II+III)	530 3	585 3,5	15600 93,5

2) Métabolites des hormones corticosurrénales

La majeure partie des métabolites tétrahydrogénés des corticostéroïdes est excrétée sous forme de glucosiduronates. On ne trouve guère plus de 4 % de ces stéroïdes dans la fraction sulfate.

a) MÉTABOLITES DU CORTISOL

— *20 α -dihydrocortisol* (20 α -DHF) :

Le métabolite du cortisol (20 α -DHF) se trouve principalement dans les fractions libre et sulfoconjuguée, il n'y en a que des traces dans la fraction glucosiduronate.

— *20 β -dihydrocortisol* (20 β -DHF) :

Ce métabolite se trouve principalement dans les fractions libre et sulfoconjuguée. Nous n'avons pas détecté le 20 β -DHF dans la fraction glucosiduronate.

— *Tétrahydrocortisol* (THF) :

Le principal métabolite des corticostéroïdes urinaires est le tétrahydrocortisol et il représente environ 40 % des corticostéroïdes après administration d'ACTH ; sa majeure partie est localisée dans la fraction glucuroconjuguée.

— *Tétrahydrocortisone* (THE) :

La tétrahydrocortisone se trouve principalement dans la fraction glucosiduronate. La quantité de ce métabolite, contrairement à ce que l'on constate en l'absence de stimulation par l'ACTH, est de deux à trois fois plus faible que le tétrahydrocortisol (THF).

— *Allo-tétrahydrocortisol* (allo-THF) :

La quantité de ce métabolite est d'un tiers de celle de la THF, après administration d'ACTH. Nous n'avons trouvé de métabolite que dans la fraction glucosiduronate. Nous n'avons pas constaté l'existence de l'allo-tétrahydrocortisone (allo-THE).

b) MÉTABOLITES DE LA CORTICOSTÉRONE (B)

— *Allo-tétrahydrocorticostérone* (allo-THB) :

Ce métabolite n'est trouvé que dans la fraction glucosiduronate. Il représente 25 % du tétrahydrocortisol qui est le principal métabolite du cortisol et 62 % des métabolites de la corticostérone.

— *Tétrahydrocorticostérone* (THB) :

Ce métabolite se répartit dans les trois fractions. Il représente 21 % des métabolites de la corticostérone.

— *Tétrahydro-11-déhydrocorticostérone* (THA) :

Ce métabolite se répartit dans les fractions sulfo- et glucuro-conjuguées. La quantité trouvée dans la fraction sulfo-conjuguée est relativement importante.

Nous n'avons pas trouvé d'allo-tétrahydro-11-déhydrocorticostérone dans les trois fractions étudiées.

c) TÉTRAHYDRO-17 α HYDROXYCORTEXONE (THS)

Ce métabolite a été trouvé en quasi-totalité dans la fraction glucosiduronate. Des traces ont été détectées dans les fractions libre et ester-sulfate.

CONCLUSION

1° Alors qu'il est classique de considérer que les hormones cortico-surrénales non transformées se trouvent dans la fraction libre des corticostéroïdes urinaires, nous avons pu démontrer leur présence dans la fraction ester-sulfate. La quasi-totalité des composés corticostérone (B) et 11-déhydrocorticostérone (A) est excrétée sous forme d'ester-sulfates.

2° En accord avec des travaux antérieurs, nous avons trouvé que la majeure partie des métabolites du cortisol et de la corticostérone est glucuroconjuguée.

3° Si le cortisol est principalement métabolisé en THF (dérivé du 5 β -prégnane) au contraire, le métabolite majeur de la corticostérone est l'allo-THB (métabolite du 5 α -prégnane).

4° La présence d'un carbonyle en 11 influence l'hydrogénation de la double liaison en position 5 β ; en effet, on ne trouve pas de métabolites de la cortisone (E), ni de la 11-déhydrocorticostérone (A) ayant la structure du 5 α -prégnane.

5° La structure du stéroïde paraît influencer dans une certaine mesure leur mode de conjugaison ; en effet, il est à remarquer que l'allo-THE n'ait pu être mis en évidence dans la fraction ester-sulfate alors que des quantités importantes ont été trouvées dans la fraction glucosiduronate.

La même remarque peut être faite pour l'allo-tétrahydrocortisol, mais les résultats sont moins nets en raison des quantités faibles de ce stéroïde.

En revanche, l'association d'un carbonyle en C_{11} et d'un hydrogène en 5β (THA) paraît favoriser la sulfoconjugaison.

6° Il est à remarquer que les métabolites du cortisol, di-hydrogénés en C_{20} , sont principalement dans les fractions libre et sulfoconjuguée. Le rapport 20α -DHF/ 20β -DHF est voisin de 2,5.

7° Si l'on compare les taux des métabolites du cortisol et ceux de la corticostérone, après administration d'ACTH, on peut en déduire qu'ils sont supérieurs aux données classiques selon lesquelles la sécrétion de corticostérone n'excéderait pas le dixième de celle du cortisol. Or, nous avons trouvé que les métabolites de la corticostérone représentent environ 35 % de ceux qui proviennent du cortisol. La quantité mesurée de cortisol n'est que 4.5 fois plus forte que celle de la corticostérone.

Nous présentons dans les *tableaux XXXV* (page 69) et *XXXVI* (page 69) la répartition en pourcentages de chaque corticostéroïde biologiquement actif et de leurs métabolites dans les différentes fractions étudiées.

* *

BIBLIOGRAPHIE

1. NEHER (R.). — *Proc. IV International Cong. of Bioch.* Edit. E. Mossettig, 1958, **4**, 128.
2. PETERSON et PIERCE (C.E.). — *J. Clin. Invest.*, 1960, **5**, 741.
3. PASQUALINI (J.R.). — *Compt. Rend. Acad. Sc.*, 1958, **246**, 2945.
4. MASON (H.L.). — *Recent Prog. Hormon Research*, 1954, **9**, 267.
5. BAGGETT (B.), KINSELLA (R.A.) et DOISY (E.A.). — *J. Biol. Chem.*, 1953, **203**, 1013.
6. GALLAGHER (T.F.), BRADLOW (H.L.), FUKUSHIMA (D.K.), BEER (Ch.T.), KRITCHEVSKY (T.H.), STOKEM (M.B.), EIDINOFF (M.L.), HELLMANN (L.) et DOBRINER (K.). — *Recent Prog. Hormon Research*, 1954, **9**, 411.
7. PASQUALINI (J.R.). — *Acta Physiologica Latinoam*, 1960, **10**, 135.

- I — Identification du sulfate de corticostérone et du sulfate de cortisol dans l'urine humaine.
 - II — Identification du 3, 21-disulfate de préjna-5-ène 3β , 21-diol 20-one.
 - III — Identification du glucosiduronate de 5β -prégnane 3α , 21-diol 20-one.
-

I — Identification du sulfate de corticostérone et du sulfate de cortisol dans l'urine humaine

Les résultats indiqués dans le chapitre précédent sur la conjugaison des corticostéroïdes urinaires, après administration d'ACTH, ont montré qu'une partie importante des hormones cortico-surrénales étaient excrétées dans la fraction ester-sulfate.

Dans ces expériences, la sulfoconjugaison des hormones avait été démontrée indirectement. Afin d'apporter la preuve directe de la nature de la conjugaison des corticostéroïdes biologiquement actifs, nous avons réalisé l'étude préliminaire suivante :

- A) Synthèse des six 21-sulfates de corticostéroïdes et étude de leurs propriétés physico-chimiques.
- B) Séparation sur papier des 21-sulfates de corticostéroïdes et électrophorèse des ester-sulfates.
- C) Méthode de détection des ester-sulfates.

A. — SYNTHÈSE DES 21-SULFATES DE CORTICOSTÉROÏDES

Les six 21-sulfates de corticostéroïdes suivants : cortexone (DOC), corticostérone (B), 11-déhydrocorticostérone (A), 17 α -hydroxycortexone (S), cortisone (E) et cortisol (F) ont été obtenus par synthèse selon la méthode de SOBEL et SPOERRI [1].

100 mg de chaque corticostéroïdes sont dissous dans 3 ml de pyridine, on ajoute 100 mg du complexe SO₃-pyridinium et on laisse réagir pendant trois jours à la température de la pièce. La pyridine est évaporée et le résidu est cristallisé dans le chloroforme, puis dans un mélange éther-méthanol (3/1 v/v). Le rendement est de 50 à 70 %.

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Nous avons déterminé le point de fusion, l'analyse élémentaire, le pouvoir rotatoire et le spectre infrarouge de ces sulfates de corticostéroïde.

1) Sulfate de cortexone (DOC) et de pyridinium

Propriétés physico-chimiques :

— *F* : 185-188°C.

— *Pouvoir rotatoire* (solution éthanolique à 95 % : c = 1,05)

$$[\alpha]_D^{22} = + 107^{\circ}.$$

— *Analyse* : C₂₆H₃₅O₆SN (489,62)

— S (calculé) : 6,53 %.

— S (trouvé) : 6,66 %.

— *Spectre infrarouge* : le spectre infrarouge du sulfate de cortexone (DOC) et de pyridinium est indiqué dans la *figure 5*.

La séquence des bandes d'absorption dans l'infrarouge et de leur intensité entre 1 800 et 800 cm⁻¹ :

Fréquence (max. cm⁻¹) :

1 705 (I)*	1 400 (M)	970 (F)
1 680 (TI)	1 270-1 210 (TI)	925 (F)
1 620 (I)	1 120 (F)	912 (F)
1 540 (M)	1 085 (F)	865 (F)
1 490 (F)	1 035 (TI)	850 (F)
1 460 (F)	1 005 (F)	830 (F)

(*) (TI) : très intense — (I) : intense — (M) : moyenne — (F) : faible — (TF) : très faible.

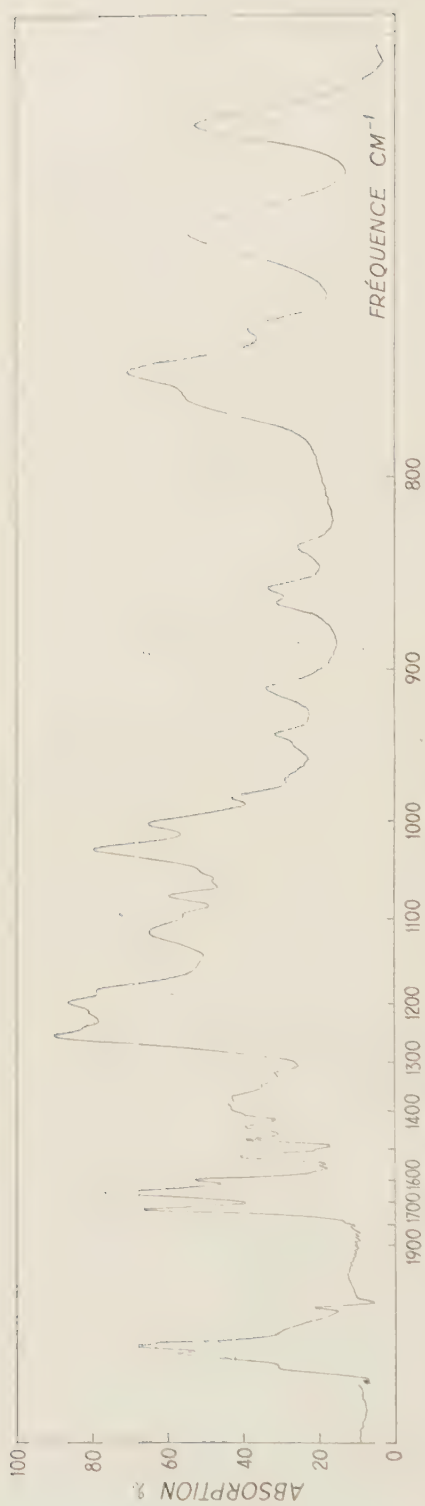


FIG. 5 : Spectre infrarouge du pyridinium 21 sulfonoloxyl 3,20-dioxo pregna 4-ène
(sulfate de cortexone (DOC) et de pyridinium)



FIG. 6 : Spectre infrarouge du pyridinium 21 sulfonoloxyl 17α-hydroxy 3,20-dioxo pregna 4-ène
(sulfate de 17α-hydroxy cortexone (S) et de pyridinium)

2) Sulfate de 17 α -hydroxycortexone (S) et de pyridinium

Propriétés physico-chimiques :

— F : 176-178°C.

$[\alpha]_D^{22^\circ} = + 89$ (solution méthanolique : $c = 0,986$).

— Analyse : $C_{26}H_{35}O_7NS$ (P.M. = 505,61)

— Calculé S % = 6,34.

— Trouvé S % = 6,06.

— Spectre infrarouge : le spectre infrarouge du sulfate de 17 α -hydroxycortexone et de pyridinium est indiqué dans la figure 6.

La séquence des bandes d'absorption dans l'infrarouge et de leur intensité entre 1 800 et 800 cm^{-1} est la suivante :

Fréquence (max. cm^{-1}) :

1 710 (I)	1 440 (F)	980 (F)
1 660 (TI)	1 100 (F)	920 (F)
1 520 (F)	1 044 (F)	900 (F)
1 400 (F)	1 022 (TI)	880 (F)
1 380 (F)	995 (F)	790 (I)
1 245-1 225 (TF)		

3) Sulfate de 11-déhydrocorticostérone (A) et de pyridinium

Propriétés physico-chimiques :

— F : 175-176°C.

— $[\alpha]_D^{22^\circ} = + 142$ (solution méthanolique : $c = 1 037$).

— Analyse : $C_{26}H_{33}O_7NS$

— Calculé S % = 6,36.

— Trouvé S % = 6,18.

— Spectre infrarouge : le spectre infrarouge du sulfate de 11-déhydrocorticostérone (A) et de pyridinium est indiqué dans la figure 7.

La séquence des bandes d'absorption dans l'infrarouge et de leur intensité entre 1 800 et 800 cm^{-1} est la suivante :

Fréquence (max. cm^{-1}) :

1 700 (TI)	1 250 (TI)	995 (F)
1 650 (I)	1 100 (F)	945 (F)
1 520 (F)	1 070 (F)	830 (F)
1 400 (F)	1 028 (TI)	855 (F)
1 350 (F)		



FIG. 7 : Spectre infrarouge du pyridinium 21 sulfonate de 11-déhydrocorticostérone (A) et de pyridinium

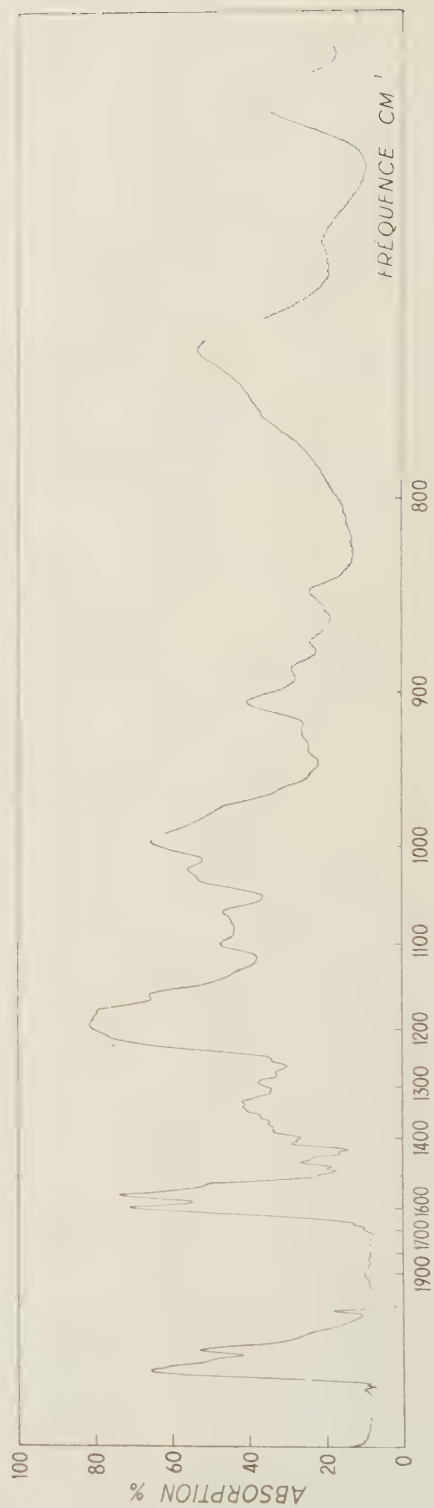


FIG. 8 : Spectre infrarouge du pyridinium 21 sulfonate de 17 α -hydroxy 3,11,20-trioxo pregna 4-ène (sulfate de cortisone (E) et de pyridinium)

4) Sulfate de cortisone (E) et de pyridinium

Propriétés physico-chimiques :

— F : 195-198°C.

— $[\alpha]_D^{22^\circ} = + 136$ (solution méthanolique : $c = 1.034$).

— Analyse : $C_{21}H_{30}O_5NS$ (P.M. 519,59)

— Calculé S % = 6,17.

— Trouvé S % = 5,90.

— Spectre infrarouge : le spectre infrarouge du sulfate de cortisone (E) et de pyridinium est indiqué dans la figure 8.

La séquence des bandes d'absorption dans l'infrarouge et de leur intensité entre 1 800 et 800 cm^{-1} est la suivante :

Fréquence (max. cm^{-1}) :

1 700 (TI)	1 190 (F)	996 (F)
1 650 (TI)	1 140 (F)	920 (M)
1 530 (F)	1 095 (F)	900 (F)
1 400 (M)	1 050 (M)	885 (F)
1 250-1 220 (TI)	1 020 (TI)	865 (F)

5) Sulfate de cortisone et de sodium *

— Spectre infrarouge : le spectre infrarouge du sulfate de cortisone et de sodium est indiqué dans la figure 9.

La séquence des bandes d'absorption dans l'infrarouge et de leur intensité entre 1 800 et 800 cm^{-1} est la suivante :

Fréquence (max. cm^{-1}) :

1 700 (I)	1 025 (F)	920 (M)
1 660 (TI)	1 040 (F)	900 (M)
1 400 (M)	1 020 (TI)	884 (F)
1 250-1 220 (TI)	996 (F)	875 (F)
1 190 (F)	950 (F)	790 (I)
1 140 (F)		

6) Sulfate de corticostérone et de potassium

Propriétés physico-chimiques :

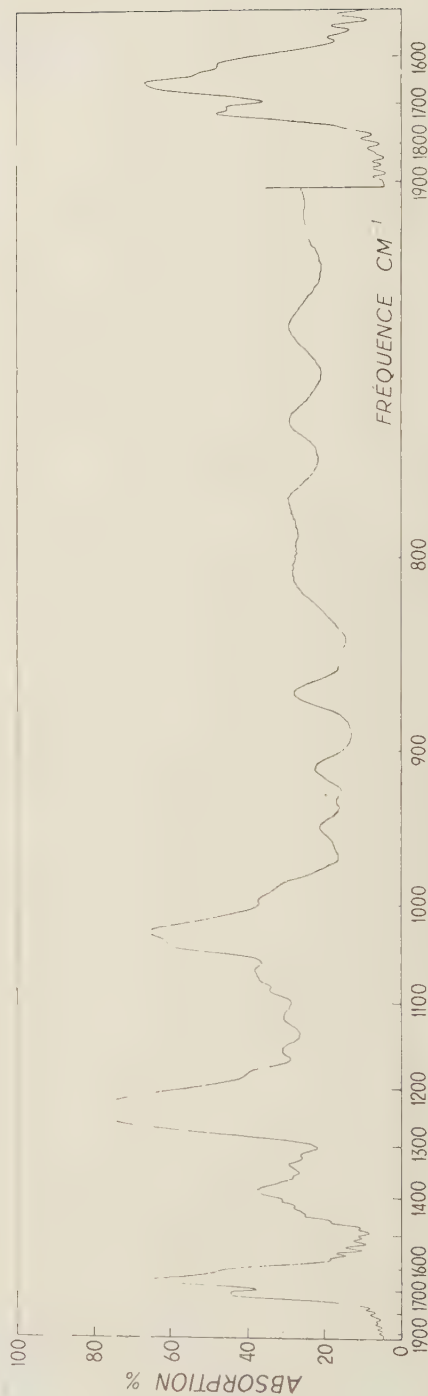
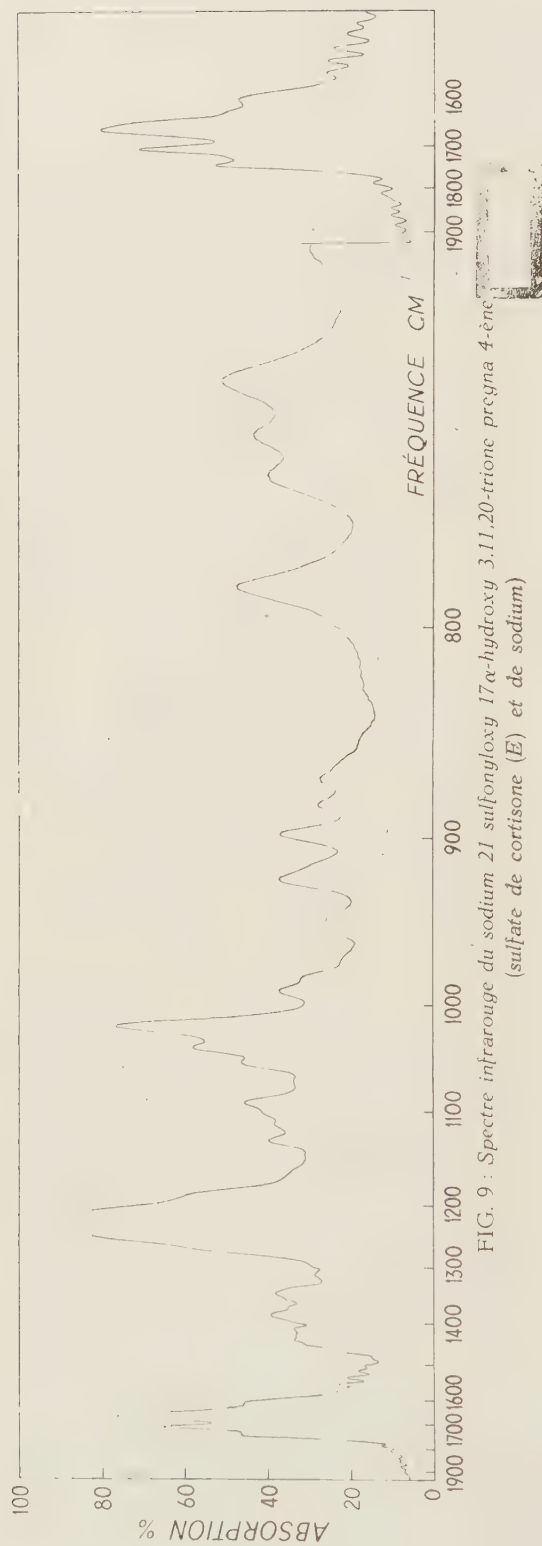
— F : 178-180°C.

— Analyse : $C_{21}H_{29}O_7KS$ (P.M. : 432)

— S (calculé) : 7,42 %.

— S (trouvé) : 7,15 %.

(*) Le sulfate de cortisone et de sodium nous a été procuré par le Docteur L.H. SARETT, que nous remercions vivement.



— *Spectre infra-rouge* : le spectre infrarouge du sulfate de corticostérone et de sodium est indiqué dans la figure 10.

La séquence des bandes d'absorption dans l'infrarouge et de leur intensité entre 1 800 et 800 cm^{-1} est la suivante :

Fréquence (max. cm^{-1}) :

1 700 (I)	1 210-1 240 (TI)	1 004 (F)
1 660 (TI)	1 163 (F)	946 (F)
1 400 (M)	1 127 (F)	912 (F)
1 348 (F)	1 106 (F)	866 (M)
	1 070 (F)	810 (F)
	1 030 (TI)	

Le sulfate de cortisol n'a pas pu être cristallisé et nous n'avons réalisé ni son analyse ni son spectre infrarouge.

DISCUSSION DES RESULTATS

L'analyse élémentaire de ces composés montre qu'ils sont des monosulfates de corticostéroïdes.

La fixation de l'acide sulfurique en C_{21} est démontrée par les faits suivants :

- Les bandes d'absorption qui sont caractéristiques de la fonction Δ_4 3-CO ne sont pas modifiées par l'estérification, ce qui serait le cas si l'acide sulfurique était conjugué à la forme énolique de la fonction Δ_4 3-CO.
- Dans la région du spectre située entre 700 et 1 300 cm^{-1} , il n'y a pas de corrélation entre les bandes d'absorption des corticostéroïdes libres et les ester-sulfates correspondants. Les deux principales bandes d'absorption communes à ces six 21-sulfates de corticostéroïdes sont situées : l'une à 1 260-1 240 cm^{-1} et l'autre à 1 035-1 025 cm^{-1} . Ces deux bandes ne sont pas trouvées pour les sulfates inorganiques qui ont un maximum d'absorption à 1 130-1 080 cm^{-1} [2].
- Les propriétés caractéristiques de la fonction Δ_4 3-CO (maximum d'absorption U.V. entre 238 et 242 $\text{m}\mu$) étaient aussi positives pour les corticostéroïdes libres que pour les sulfates correspondants.
- Les six sulfates obtenus par synthèse ne réduisent pas le bleu de tétrazolium ; la réaction devient positive après solvolysse.
- Différents auteurs ont étudié les bandes d'absorption des sulfates organiques. COLTHUP [12] considère que les bandes d'absorption

sont caractéristiques de ces substances à $1\,260\text{--}1\,150\text{ cm}^{-1}$, $1\,080\text{--}1\,010\text{ cm}^{-1}$ et entre $700\text{--}600\text{ cm}^{-1}$. HASZELDINE et KIDD [13] donnent pour les acides sulfoniques des bandes d'adsorption placées à $1\,190\text{--}1\,170$ et une autre à $1\,064\text{--}1\,040\text{ cm}^{-1}$.

B. — SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE SUR PAPIER DES SIX 21-SULFATES DE CORTICOSTÉROÏDES

Après avoir réalisé la synthèse de ces six sulfates de corticostéroïdes, nous avons étudié leur séparation chromatographique sur papier comparativement avec le sulfate de déhydroépiandrosterone et de sodium.

TABLEAU XXXVII : Séparation de différents sulfates de corticostéroïdes et du sulfate de déhydroépiandrosterone dans quatre systèmes chromatographiques

CONJUGUES	SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES				
	I		II	III	IV
	$R_{SO_4\text{DOC}}$	R_{SO_4B}	$R_{SO_4\text{DOC}}$	$R_{SO_4\text{DOC}}$	$R_{SO_4\text{DOC}}$
Sulfate de DOC et de Py	1	2,50	1	1	1
Sulfate de DOC et de Na	1	2,50	1	1	1
	1,20 cm/h		0,51 cm/h	1,3 cm/h	0,69 cm/h
Sulfate de A et de Py	0,36	0,92	0,54	0,61	0,33
Sulfate de B et de Py	0,40	1	0,58	0,70	0,37
Sulfate de S et de Py	0,30	0,78	0,50	0,78	0,43
Sulfate de E et de Py	0,16	0,42	0,25	0,46	0,18
Sulfate de E et de Na	0,16	0,42	0,25	0,46	0,18
Sulfate de F et de Py	0,25	0,55	0,35	0,58	0,25
Sulfate de DHEA et de Na	1,15	2,87	1,13	1	1

Nous avons réalisé la chromatographie dans les deux systèmes suivants :

- I — Acétate de butyle-toluène-butanol/ NH_4OH 4N-méthanol (60-30-10)/(50-50).
- II — Acétate de butyle-toluène-butanol/acide acétique-eau-méthanol (50-40-10)/(5-45-50) et nous les avons comparés avec les systèmes :
- III — Alcool isoamylique-hexane/ NH_4OH conc.-eau (40-10)/(28-22) [3].
- IV — Acétate de butyle-butanol/acide formique-eau (80-20)/(10-90) [4].

Le *tableau XXXVII* montre les R_f de ces six sulfates par rapport au sulfate de cortexone dans ces différents systèmes, ainsi que celui du sulfate de déhydroépiandrostérone (DHEA) et la vitesse de migration du sulfate de DOC.

ELECTROPHORESE SUR PAPIER DES ESTER-SULFATES

Les ester-sulfates sont dissous dans l'éthanol et placés sur des bandes de papier Carl Schleicher et Schüll-Dassel N° 2043.

L'électrophorèse est réalisée dans un appareil du type GRASSMAN et HANNIG [5], en utilisant un tampon carbonate d'ammonium 0,15 M à pH 8,8 et un tampon borate de sodium 0,35 M à pH 8,4.

L'électrophorèse est réalisée pendant 7 h sous une tension de 60 V, 1mA/cm à 22°C.

Nous avons constaté que, dans ces conditions, les six 21-sulfates de corticostéroïdes migrent avec la même vitesse.

Nous avons comparé leur migration avec le 3 α -sulfate d'androstérone et avec le 3 α -sulfate de prégnanolone.

Ces résultats sont indiqués dans le *tableau XXXVIII*.

TABLEAU XXXVIII : Migration électrophorétique en cm/h de différents ester-sulfates de stéroïdes

Stéroïdes conjugués	Tampon carbonate d'ammonium	Tampon borate de sodium
3 α -sulfate d'androstérone	1.22	1.07
Six 21-sulfates de corticostéroïdes (DOC, A, B, S, E, et F)	1.10	1
3 α -sulfate de prégnanolone	0.8	0.71

C. — MODES DE DÉTECTION DES ESTER-SULFATES SUR LE CHROMATOGRAMME

Les taches d'ester-sulfates ont d'abord été repérées par la réaction au bleu de méthylène-chloroforme (p. 32).

Après migration chromatographique ou électrophorétique les sulfates de corticostéroïdes sont hydrolysés ou solvolysés par la technique de SCHNEIDER et LEWBART modifiée, ou par application de la technique de COHEN et ONESON (p. 28).

On révèle l'ion-sulfate libéré par la réaction au rhodizonate (p. 32).

Nous avons constaté que les 21-sulfates de corticostéroïdes ne réduisent pas le bleu de tétrazolium ; après hydrolyse, cette réaction devient positive (p. 32).

Nous avons appliqué aux stéroïdes libres et aux ester-sulfates correspondants les méthodes de révélation du groupement Δ_4 3-CO : absorption à 254 m μ et fluorescence en lumière de Wood après chauffage en milieu sodique ainsi que la réaction de fluorescence par action de l'acide phosphorique à 15 %, également en lumière de Wood ; nous avons constaté que toutes ces réactions étaient positives avec les sulfates de corticostéroïdes ainsi qu'avec les stéroïdes libres correspondants.

CONCLUSIONS

Des résultats de la séparation chromatographique sur papier et de la migration électrophorétique, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° Les systèmes décrits permettent de réaliser la séparation des 21-sulfates de corticostéroïdes par chromatographie sur papier.

2° L'hydrolyse de ces corticostéroïdes conjugués est obtenue par les procédés indiqués.

3° Les 21-sulfates de corticostéroïdes ne donnent pas la réaction au bleu de tétrazolium ; cette réaction devient positive après hydrolyse directe sur le chromatogramme.

4° Les méthodes générales de révélation sur papier des 3-sulfates de stéroïdes sont applicables aux 21-sulfates de corticostéroïdes.

5° Nous avons constaté que les migrations des ester-sulfates de cortexone et de pyridinium et de cortisone et de pyridinium sont respectivement les mêmes que celles des ester-sulfates de cortexone et de sodium et de cortisone et de sodium.

6° On doit signaler que l'ester-sulfate de cortisone est plus polaire que l'ester-sulfate de cortisol dans tous les systèmes essayés. Il en est de même pour le sulfate de 11-déhydrocorticostérone qui est plus polaire que le sulfate de corticostérone ; donc les polarités de ces sulfates sont inversées par rapport à celle du stéroïde libre.

7° L'électrophorèse montre que les six 21-sulfates de corticostéroïdes ont la même vitesse de migration, mais il est possible de les séparer par ce procédé des sulfates de stéroïdes moins polaires comme les sulfates de 17-céto-stéroïdes.

* *

Identification du sulfate de corticostérone dans l'urine humaine

Après avoir étudié les conditions expérimentales : propriétés physico-chimiques, séparations chromatographiques sur papier et détection des taches de 21-sulfates de corticostéroïdes, nous avons appliqué cette étude à la fraction ester-sulfate des extraits urinaires obtenus après administration exogène de l'hormone.

1) Matériel biologique

300 mg de corticostérone ont été administrés par voie orale à un sujet normal pendant vingt-quatre heures et les urines des quarante-huit heures suivant la première prise ont été recueillies.

2) Extraction des corticostéroïdes totaux

Les corticostéroïdes ont été extraits des urines à pH 7,0 par la méthode d'EDWARDS et coll. (p. 24).

3) Fractionnement des corticostéroïdes conjugués

L'extrait sec est dissous dans 100 ml d'eau et les corticostéroïdes libres sont extraits par 3 fois 1 volume de dichlorométhane ; la phase aqueuse, évaporée à sec, est fractionnée par alumine par la méthode de O. CRÉPY en ester-sulfates et glucosiduronates.

4) Purification de la fraction ester-sulfate

La fraction ester-sulfate a été purifiée par une seconde chromatographie sur alumine. Certaines impuretés sont éliminées par précipitation dans un mélange d'acétone/chloroforme 3/1 v/v, les ester-sulfates restant en solution.

5) *Systèmes chromatographiques utilisés*

a) CHROMATOGRAPHIE DES CORTICOSTÉROÏDES SULFO-CONJUGUÉS

- I) Toluène-acétate de butyle-n-butanol/méthanol-NH₄OH (4N) (30-60-10)/(50-50).
- II) Toluène-acétate de butyle-n-butanol/méthanol-acide acétique-eau (40-50-10)/(50-5-45).
- III) Alcool isoamylique-hexane/NH₄OH conc.-eau (40-10)/(28-22).

b) CHROMATOGRAPHIE DES CORTICOSTÉROÏDES LIBRES ET ACÉTYLÉS

- 1) Chloroforme/formamide.
- 2) Benzène/formamide.
- 3) Toluène/propanediol.
- 4) Cyclohexane-benzène (1-1)/propanediol.

6) *Hydrolyse ou solvolysé sur le papier*

Les techniques d'hydrolyse sur le chromatogramme sont indiquées page 28, ainsi que les modes de détection de l'ester-sulfate du corticostéroïde et de l'ion sulfate libéré.

7) *Fractionnement chromatographique des ester-sulfates*

La fraction ester-sulfate des extraits urinaires est chromatographiée dans le système III, p. 82.

La région correspondant au sulfate de corticostérone de synthèse, chromatographiée en parallèle, est éluée et chromatographiée successivement dans les systèmes I et II (p. 82).

La zone du dernier chromatogramme correspondant au 21-sulfate de corticostérone est éluée, hydrolysée par la sulfatase purifiée et les stéroïdes libérés sont chromatographiés dans les systèmes 1, 2, 3 pour les stéroïdes libérés et dans le système 4 pour leur acétate.

8) *Résultats*

La *figure 11* indique les différentes étapes réalisées pour l'identification du sulfate de corticostérone dans l'urine.

Dans les systèmes indiqués plus haut, nous avons trouvé à la même hauteur que le sulfate de corticostérone de synthèse, une réaction positive au bleu de méthylène qui est utilisée pour la détection des ester-sulfates sur le chromatogramme.



FIGURE 11

Identification du sulfate de corticostérone dans l'urine humaine

Sur le second chromatogramme, nous avons identifié les ester-sulfates ; d'une part par la réaction au rhodizionate (p. 32), et d'autre part par la réaction au bleu de tétrazolium qui devient positive après solvolysé, sous l'action du mélange dioxane-acide chlorhydrique (p. 28).

Enfin, la tache d'ester-sulfate a également été repérée à 254 m μ .

Après élution de la zone correspondant au 21-sulfate de corticostérone de synthèse sur le troisième chromatogramme, les stéroïdes conjugués sont hydrolysés. Après hydrolyse, nous avons extrait par le dichlorométhane et nous avons constaté l'existence d'une seule tache réduisant le bleu de tétrazolium et qui avait la même migration que la corticostérone dans les trois systèmes chromatographiques utilisés ; elle présentait une absorption à 254 m μ , et une fluorescence en milieu sodique en lumière de WOOD.

Son acétate avait la même migration et les mêmes caractéristiques que l'acétate de corticostérone chromatographié en parallèle.

* *

Identification du sulfate de cortisol dans l'urine humaine

1) Matériel biologique

Trois prises de 100 mg de cortisol ont été administrées par voie orale en 24 heures à un sujet normal, et les urines ont été recueillies pendant les 36 heures suivant la première prise.

2) Extraction des corticostéroïdes totaux

Les urines additionnées de 5 % de chlorure de sodium ont été extraites par 3 fois 1 volume de n-butanol.

3) Fractionnement et purification des stéroïdes conjugués

Le fractionnement des corticostéroïdes conjugués et la purification de la fraction ester-sulfate sont les mêmes que pour l'identification du sulfate de corticostérone.

4) Hydrolyse

Le mode d'hydrolyse est le même que celui indiqué précédemment (p. 82).

5) *Systèmes chromatographiques*

a) CHROMATOGRAPHIE DES CORTICOSTÉROÏDES CONJUGUÉS

Les ester-sulfates ont été chromatographiés dans les systèmes I, II et III indiqués précédemment (p. 82).

b) CHROMATOGRAPHIE DES CORTICOSTÉROÏDES LIBRES ET ACÉTYLÉS

Les systèmes chromatographiques suivants ont été utilisés :

- 1) Chloroforme-formamide.
- 2) Acétate, d'éthyle-toluène/méthanol-eau (1-9/5-5).
- 3) Toluène/propanediol.

6) *Solvolyse des ester-sulfates*

La technique d'hydrolyse par solvolyse a été indiquée p. 28.

7) *Electrophorèse sur papier*

Les détails des conditions expérimentales de l'électrophorèse des ester-sulfates sont indiqués p. 79.

8) *Mode opératoire*

La fraction ester-sulfate provenant de la chromatographie sur alumine a été chromatographiée dans le système III (système alcalin) puis, successivement, dans les systèmes II (système acide) et I (système alcalin). Le 21-sulfate de cortisol de synthèse a été utilisé comme ester-sulfate de référence.

Une autre fraction a été solvolysée ; les stéroïdes libérés ont été chromatographiés dans les systèmes 1 et 2 et, après acétylation, dans le système 3.

Une troisième fraction de l'éluat a été soumise à une électrophorèse, en parallèle avec le sulfate de cortisol. Elle a été éluee, solvolysée et le stéroïde libéré chromatographié dans le système 1.

9) *Résultats*

La *figure 12* indique les différentes étapes suivies pour l'identification du sulfate de cortisol.

Les ester-sulfates ont été détectés dans les différents systèmes chromatographiques par la réaction au bleu de méthylène.

Le stéroïde libéré, après hydrolyse d'une partie de l'éluat du troisième chromatogramme, avait la même migration et les mêmes carac-

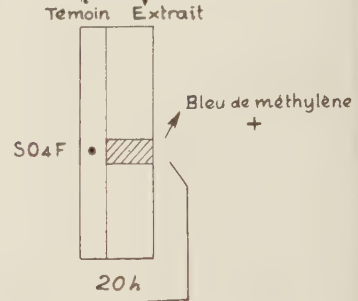
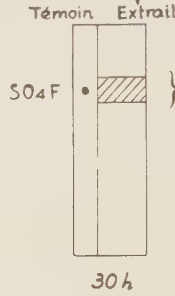
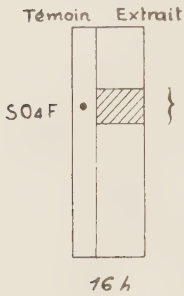
EXTRAIT URINAIRE

Fraction Ester-Sulfate

Al. isoamylique-Hexane/
HONH₄-Eau

Toluène- η Acét Butyle- η butanol/
acide acét. 10% méthanol

Toluène- η -butyl acétate- η -butanol/
HONH₄-Eau



Elution

Electrophorèse

Sulfatase

Solvolyse
(dioxane-acide trichloroacétique)



Elution

Solvolyse

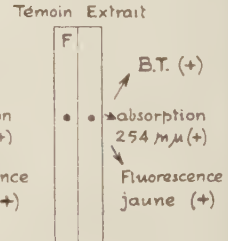
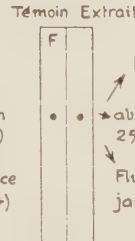
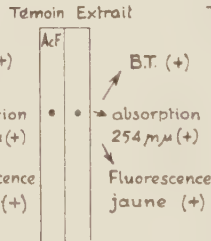
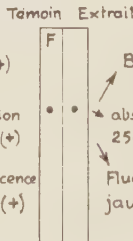
Chloroforme/
Formamide

Bush C

Toluène/
propylène-glycol

Bush C

Chloroforme/
Formamide



B.T. (+)
absorption
254 m μ (+)
Fluorescence
jaune (+)

B.T. (+)
absorption
254 m μ (+)
Fluorescence
jaune (+)

B.T. (+)
absorption
254 m μ (+)
Fluorescence
jaune (+)

B.T. (+)
absorption
254 m μ (+)
Fluorescence
jaune (+)

B.T. (+)
absorption
254 m μ (+)
Fluorescence
jaune (+)

FIGURE 12

Identification du sulfate de cortisol dans l'urine humaine

téristiques que le cortisol dans les systèmes 1 et 2, et son acétate avait la même migration que l'acétate de cortisol chromatographié dans le système 3.

Le stéroïde libéré après solvolysé par le mélange dioxane-trichloro-acétique, présentant les mêmes propriétés que le cortisol.

La fraction qui a été soumise à l'électrophorèse avait la même migration que les 21 mono-sulfates de corticostéroïdes. Cette fraction présentait une absorption positive à 254 m μ et une réaction positive au bleu de méthylène. Après élution et solvolysé, le stéroïde libéré présentant les mêmes R_f que le cortisol avant et après acétylation.

Nous avons étudié le taux de la corticostérone et du cortisol dans les différentes fractions, en appréciant semi-quantitativement la réaction au bleu de tétrazolium et la fluorescence sodique du chromatogramme.

Les résultats sont indiqués sur le *tableau XXXIX*.

TABLEAU XXXIX : Répartition quantitative de la corticostérone et du cortisol dans les différentes fractions

FRACTION	Hormone administrée (300 mg de B et de F)	
	Corticostérone µg o/oo d'urine	Cortisol µg o/oo d'urine
Libre	5	1200
Sulfoconjuguée	800	700
Glucosiduronate	100	120

DISCUSSION

L'ensemble de ces résultats apporte la confirmation de nos recherches antérieures sur l'existence des ester-sulfates de la corticostérone et du cortisol dans l'urine humaine.

L'identification de la corticostérone et du cortisol de la fraction sulfoconjuguée a été établie après hydrolyse, dans trois systèmes chromatographiques différents ainsi que par la migration identique de leurs acétates avec les acétates de corticostérone et de cortisol de synthèse.

La preuve que ces deux conjugués sont des esters-sulfates en C_{21} est donnée :

1° Par l'identité de leur migration avec le sulfate de corticostérone et le sulfate de cortisol de synthèse utilisés comme standards de référence.

2° Par leur réaction positive au bleu de méthylène.

3° Par l'identification de l'ion sulfate après hydrolyse (réaction positive au rhodizonate).

4° Par la solvolysé de l'ester-sulfate.

L'évidence de la conjugaison avec l'acide sulfurique en C_{21} est donnée :

1° Par l'identité de comportement chromatographique avec le 21-sulfate de corticostérone et le 21-sulfate de cortisol de synthèse.

2° Par la réaction positive au bleu de tétrazolium après solvolysé ou hydrolyse : cette réaction est négative pour le 21-sulfate de corticostéroïdes, en raison du blocage de la fonction α -cétoïque et de la stabilité de l'ester-sulfate en milieu alcalin.

3° Par la positivité des réactions de groupement Δ_4 3-CO avant hydrolyse.

CONCLUSION

Après administration de cortisol et de corticostérone, la présence des 21-sulfates de cortisol et de corticostérone est démontrée. La majeure partie de la corticostérone et un tiers du cortisol sont excrétés sous cette forme.

II — Identification du 3, 21-disulfate de pré-gna-5-ène 3 β , 21-diol 20-one dans l'urine humaine

1) Introduction

Au cours des recherches sur la chromatographie sur alumine pour la séparation des ester-sulfates et des glucosiduronates urinaires, O. CRÉPY avait remarqué la présence dans les premiers éluats de glucosiduronates, d'une petite fraction d'un conjugué donnant une réaction de VLITOS positive.

Cette fraction polaire a été nommée ester-sulfate II afin de bien la différencier de la majeure partie des ester-sulfates (ester-sulfates I), nettement séparés de celle-ci.

Nous avons repris l'étude de la fraction ester-sulfate II et nous avons réussi à la séparer par chromatographie sur alumine, des glucosiduronates qui l'accompagnaient.

Ces esters-sulfates polaires (ester-sulfates II) ont été hydrolysés par la sulfatase et, après extraction et chromatographie des stéroïdes libérés, nous avons constaté que ceux-ci étaient composés en majeure partie d'une substance donnant une réaction positive au bleu de tétrazolium, que nous avons essayé d'isoler et d'identifier.

Nous allons décrire les détails de ces recherches qui nous ont permis de séparer ce conjugué, d'identifier son principal composant stéroïde et, finalement, d'apporter la preuve de la nature de sa conjugaison.

2) *Matériel biologique*

Nous avons utilisé les stéroïdes conjugués provenant de 10 litres d'urines de sujets normaux, ayant reçu 2 fois 40 U.I. d'ACTH-zinc, à 12 h d'intervalle, les urines de 24 h ont été recueillies à partir de la deuxième injection.

3) *Extraction des stéroïdes conjugués*

Les urines à pH 7 sont additionnées de 50 % p/V de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ extraites par 3 fois un volume du mélange éther-éthanol (3/1-v/v) (p. 24).

4) *Chromatographie sur alumine des stéroïdes conjugués*

a) SÉPARATION DES ESTER-SULFATES ET DES GLUCOSIDURONATES

L'extrait sec est dissous dans 100 ml d'eau. Les corticostéroïdes libres sont extraits par le dichlorométhane et les stéroïdes conjugués correspondant à 1 litre d'urine sont chromatographiés sur 30 g d'alumine (p. 24).

b) SÉPARATION DE LA FRACTION ESTER-SULFATE II

Les éluats contenant le mélange des glucosiduronates repérés par la réaction de TOLLENS et des ester-sulfates II repérés par la réaction de VLITOS, sont soumis à une seconde chromatographie sur une colonne de 20 g d'alumine BROCKMANN dans l'éthanol.

L'éluion est réalisée avec les solvants suivants :

- 1) 100 ml d'éthanol à 96 %
- 2) 100 ml » à 90 %
- 3) 200 ml » à 80 %
- 4) 200 ml » à 60 %
- 5) 150 ml » à 40 %
- 6) 200 ml » à 20 %
- 7) 200 ml » à 10 %
- 8) 200 ml de solution ammoniacale 0,001 N

L'eau utilisée pour les mélanges est distillée et neutralisée à pH 7.5 avec HONH_4 0,1 N.

Les éluats sont partagés en fractions de 10 ml et dans chaque tube les ester-sulfates sont détectés par la réaction du bleu de méthylène et les glucosiduronates par la réaction de TOLLENS (p. 27).

5) *Chromatographie sur papier de la fraction ester-sulfate II et des ester-sulfates de référence*

La fraction ester-sulfate II exempte de glucosiduronates a été chromatographiée dans les deux systèmes suivants :

I) Toluène-acétate de butyle-butanol/méthanol- NH_4OH 4 N (3-6-1/5-5).

II) Acétate de butyle-butanol/ NH_4OH 4 N (1-3/4).

6) *Electrophorèse des ester-sulfates II*

Cf. p. 79.

7) *Détection des ester-sulfates*

Après migration chromatographique ou électrophorétique, les ester-sulfates ont été repérés par la réaction au bleu de méthylène-chloroforme (p. 32).

8) *Hydrolyse des ester-sulfates sur le chromatogramme*

Les ester-sulfates ont été hydrolysés par la technique de SCHNEIDER et LEWBART (p. 28).

L'ion sulfate a été détecté par la réaction au rhodizonate (p. 32) et les corticostéroïdes libérés par la réaction au bleu de tétrazolium (p. 31).

9) *Solvolyse*

Une partie des ester-sulfates provenant de l'éluion du chromatogramme est solvolysée par le dioxane trichloracétique (p. 28).

10) *Hydrolyse enzymatique*

Une autre fraction des ester-sulfates provenant de l'élution des chromatogrammes est hydrolysée par addition de sulfatase purifiée d'*Helix pomatia* (p. 27).

11) *Systèmes chromatographiques utilisés pour les corticostéroïdes libérés de la fraction ester-sulfate II*

- III) Chloroforme/formamide.
- IV) Isooctane/méthanol-eau (5/3-2).
- V) Toluène/propanediol.
- VI) Ligoïne/propanediol.
- VII) Isooctane/propanediol.
- VIII) Décaline/propanediol.

12) *Acétylation*

Les stéroïdes libérés sont acétylés par le mélange anhydride acétique-pyridine (p. 31).

Les acétates de stéroïdes peu polaires sont chromatographiés par chromatographie d'adsorption sur papier sans phase stationnaire en utilisant la méthode qui sera décrite p. 108.

13) *Systèmes chromatographiques utilisés pour les acétates de stéroïdes peu polaires*

Les solvants utilisés sont :

- IX) Ligoïne (Eb : 65-85°).
- X) Isooctane.

14) *Standards de référence utilisés*

- Tétrahydrocortexone : 5 β prégnane 3 α , 21-diol 20 one.
- (3 β , 5 α) tétrahydrocortexone : 5 α prégnane 3 β , 21-diol 20 one.
- (3 β , 5 β) tétrahydrocortexone : 5 β prégnane 3 β , 21-diol 20 one.
- 21-hydroxyprégnanolone : prégnane 5-ène 3 β , 21-diol 20 one.
- Cortisol.
- Cortisone.
- Corticostérone.
- 21 monosulfate de cortisone.
- 21 monosulfate de cortexone (DOC).
- 3,17 disulfate de 5 α androstane 3 β , 17 β -diol.
- 3,21 disulfate de prégnane 5-ène 3 β , 21-diol 20-one (préparation p. 92).

15) Préparation du disulfate de préjna 5-ène 3β , 21-diol 20-one

10 mg de préjna 5-ène 3β , 21-diol 20-one ont été traités par le complexe SO_3 -pyridine en milieu pyridinique selon la technique de SOBEL et SPOERRI. Après évaporation de la pyridine, le résidu sec est dissous dans un mélange méthanol-chloroforme 3/1 v/v. La solution est évaporée et chromatographiée dans le système acétate de butyle-butanol/hydroxyde d'ammonium 4 N (25-75/100). On obtient deux taches d'ester-sulfates ayant respectivement un R_f de 0,28 et 0,78, et donnant une réaction de VLITOS positive. La tache la moins polaire réduit le bleu de tétrazolium et la tache la plus polaire ne réduit ce réactif qu'après solvolysé. Le sulfate le plus polaire a été élué par l'éthanol à 50 %. Nous avons constaté que cet ester-sulfate isolé était plus polaire que tous les monosulfates de corticostéroïdes connus. Sa migration chromatographique et électrophorétique était voisine de celle du 5α -androstane 3β , 17β -diol 3,17-disulfate. La quantité de ce composé était trop faible pour l'obtenir à l'état cristallisé.

Il possède toutes les propriétés des stéroïdes sulfoconjugués : réaction de VLITOS positive, réaction au rhodizonate qui devient positive après solvolysé sur le papier.

De l'ensemble de ces données, nous pouvons conclure que le sulfate le plus polaire que nous avons obtenu par synthèse est bien le 3, 21, disulfate de 21 hydroxy pregnénolone.

16) Résultats

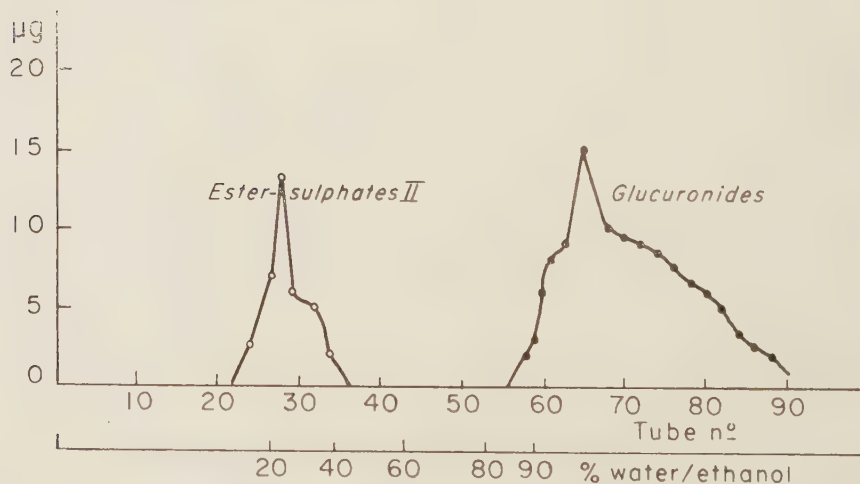


FIGURE 13 : Séparation sur colonne d'alumine de la fraction sulfate polaire et de la fraction glucosiduronate

Nous avons montré sur la *figure 3* (p. 45) la séparation des stéroïdes conjugués par chromatographie sur alumine. Nous voyons sur cette figure que la fraction ester-sulfate I, qui contient la quasi-totalité des ester-sulfates, est nettement séparée de la fraction glucosiduronate.

On remarque que dans les premiers éluats contenant les glucosiduronates, se trouvent des substances positives à la réaction de VLITOS (fraction ester-sulfate II).

La *figure 13* montre la séparation de la fraction ester-sulfate II par une deuxième chromatographie utilisant les mélanges de solvants indiqués p. 90.

La fraction ester-sulfate II, exempte de glucosiduronate, est éluee par l'éthanol à 40 % : les glucosiduronates sont élués par l'éthanol à 10 % et par une solution ammoniacale d'eau pH = 8,4.

a) COMPOSITION DE LA FRACTION ESTER-SULFATE II

La fraction ester-sulfate II est solvolysée, extraite par le dichlorométhane et le résidu sec est chromatographié dans le système III (p. 91), en utilisant comme standards de référence le cortisol, la cortisone et la corticostérone.

Nous avons constaté que la majeure partie des substances réduisant le bleu de tétrazolium migrerait avec le front du solvant dans le système chloroforme/formamide.

Cette fraction a été éluee et rechromatographiée dans cinq systèmes différents dans lesquels elle n'a donné qu'une seule tache d'un stéroïde réduisant le bleu de tétrazolium.

La migration de ce stéroïde peu polaire, comparativement à celle des isomères de la THDOC et à celle du 21 hydroxy-prégnenolone est indiquée dans le *tableau XL*.

Il apparaît nettement que le R_f du corticostéroïde provenant de la fraction ester-sulfate II est identique à celui de la 21-hydroxy-prégnenolone.

On acétyle le corticostéroïde provenant de l'élution du chromatogramme ainsi que les 2 isomères équatoriaux de la THDOC et la 21-hydroxy-prégnenolone. Les acétates sont chromatographiés sur papier, non imprégné de phase stationnaire, à l'aide des solvants IX et X (p. 108).

Le *tableau XLI* indique que le R_f de l'acétate du corticostéroïde de la fraction ester-sulfate II ainsi que ceux des acétates des standards de référence.

SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES					
Stéroïdes	Structure	Toluène/ propanediol (4 h) R _{THDOC}	Isooctane/ méthanol-eau 5/3-2 (8h) R _{THDOC}	Isooctane/ propanediol (130h) R _{THDOC}	Decaline/ propanediol (135h) R _{THDOC}
					Ligroïne propanediol (60h) R _{THDOC}
Composé de l'ester sulfate II		0.84	0.88	0.61	0.62
Pregna 5-ène, 3 β , 21-diol 20-one	3 β , Δ_5	0.83	0.88	0.60	0.62
5 α -pregnane 3 β , 21-diol 20-one	3 β , 5 α	0.85	0.88	0.86	0.87
5 β -pregnane 3 α , 21-diol 20-one (THDOC)	3 α , 5 β	1	1	1	1
5 β -pregnane 3 β , 21-diol 20-one	3 β , 5 β	1.25	1.70	1.53	1.66

TABLEAU XL (ci-dessus) : R_i du corticostéroïde isolé de la fraction ester-sulfate II dans différents systèmes chromatographiques

Acétates	Structure	SOLVENTS	
		Isooctane R _{diac} .THDOC	Ligroïne R _{diac} .THDOC
Acétate du composé de l'ester-sulfate II		0.66	0.53
3, 21-diacétate du pregnane 5-ène 3 β , 21-diol 20-one	3 β , Δ_5	0.66	0.56
3, 21-diacétate du 5 α -pregnane 3 β , 21-diol 20-one	3 β , 5 α	0.71	0.63
3, 21-diacétate du 5 β -pregnane 3 α , 21-diol 20-one	3 α , 5 β	1	1

TABLEAU XLI (ci-contre) : R_i de l'acétate du corticostéroïde de la fraction ester-sulfate II (chromatographie d'adsorption sur papier)

On constate sur ce tableau que l'isomère équatorial de structure $3\alpha-5\beta$, est nettement moins polaire que le corticostéroïde étudié. Ce dernier a une polarité voisine de celle du diacétate de 5α -prégnane 3β , 21-diol 20-one et de celle du diacétate de prégnane-5-ène 3β , 21-diol 20-one.

Il est un peu plus proche du second que du premier.

— *Propriétés physico-chimiques du principal stéroïde de la fraction ester-sulfate II :*

Les réactions de caractérisation du composé de la fraction ester-sulfate II sont indiquées au *tableau XLII*.

TABLEAU XLII : *Réactions de caractérisation du corticostéroïde de la fraction ester-sulfate II*

Réactions de caractérisation	Composé de la fraction ester sulfate II	Pregna 5-ène 3β , 21-diol 20-one	5α -pregnane 3β , 21-diol 20-one
Réaction au bleu de tétrazolium	Positive	Positive	Positive
Réaction de Porter et Silber	Négative	Négative	Négative
Réaction de Zimmermann	Négative	Négative	Négative
Absorption à $254\text{ m}\mu$	Négative	Négative	Négative
Fluorescence en milieu sodique (lumière de Wood)	Négative	Négative	Négative
Maximum d'absorption à l'acide sulfurique concentré ($\text{m}\mu$) $\left[\begin{array}{c} 1\% \text{ mg/ml} \\ E \\ 1\text{ cm} \end{array} \right]$	320	320	320
Formation de formol après oxydation par l'acide périodique	Positive	Positive	Positive
Maximum d'absorption en milieu acide sulfurique-éthanol ($\text{m}\mu$) $\left[\begin{array}{c} 1\% \text{ mg/ml} \\ E \\ 1\text{ cm} \end{array} \right]$	405	405	Ne présente pas de maximum d'absorption entre 400 et $410\text{ m}\mu$

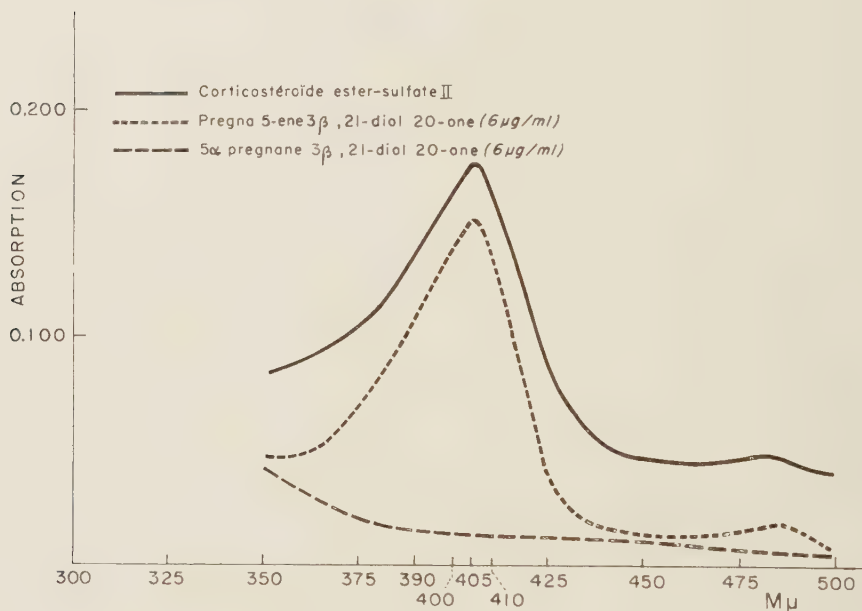
— *Spectre d'absorption dans l'acide sulfurique-éthanol :*

Le spectre d'absorption du stéroïde de la fraction ester-sulfate II dans le mélange acide sulfurique-éthanol (2/1, v + v) entre 350 et $500\text{ m}\mu$, est indiqué dans la *figure 14*.

Nous pouvons constater que le stéroïde étudié ainsi que le 21-hydroxyprégnénolone ont le même maximum d'adsorption à 405 m μ , ce maximum est caractéristique de la fonction Δ_5 3 β -OH stéroïdes. Le spectre du 5 α prégnane 3 β , 21-diol 20-one réalisé en parallèle ne présente pas de maximum entre 375 et 500 m μ .

FIGURE 14

Spectre d'absorption dans le réactif acide sulfurique-éthanol (2/1, v/v)



— *Spectre infrarouge :*

Une partie de la fraction ester-sulfate II, hydrolysée par la sulfatase, a été chromatographiée dans le système toluène/propanediol, la région correspondant à la 21-hydroxyprégnénolone (prégna 5-ène 3 β , 21-diol 20-one), utilisée comme standard, a été éluée et chromatographiée à nouveau dans le système : isooctane/méthanol-eau (5/3-2), la région correspondant au corticostéroïde prégna 5-ène 3 β , 21-diol 20-one a été éluée et purifiée sur gel de silice (p. 34) et son spectre infrarouge a été réalisé dans le spectrophotomètre PERKIN-ELMER.

Le spectre du stéroïde isolé présente une bande d'absorption à 1045 cm $^{-1}$ qui est caractéristique des stéroïdes ayant la structure

Δ_5 3 β -OH et une autre bande à 1 705 cm^{-1} caractéristique de la fonction cétonique en C₂₀.

Le spectre infrarouge de l'acétate du stéroïde isolé a été également effectué et présente une bande d'absorption à 1 740 cm^{-1} caractéristique de la fonction 21-acétoxy 20-cétonique et une bande d'absorption à 1 240 cm^{-1} caractéristique de la fonction 3-acétoxy stéroïde.

— Dosage quantitatif :

La réaction au bleu de tétrazolium a été utilisée pour doser le corticostéroïde de la fraction ester-sulfate II, les résultats sont indiqués dans le *tableau XLIII*.

TABLEAU XLIII : *Evaluation quantitative du stéroïde de la fraction ester-sulfate II*

SOURCE	Corticostéroïde isolé de la fraction ester-sulfate II μg o/oo d'urine
Urine après administration d'ACTH	70
Urine de grossesse 7ème mois	25

b) NATURE DE LA CONJUGAISON
DE LA FRACTION ESTER-SULFATE II

Afin d'apporter la preuve directe de la nature de la conjugaison du corticostéroïde principal de la fraction ester-sulfate II, nous avons comparé ces conjugués avec : le 3,21-disulfate de prégnà 5-ène 3 β , 21-diol 20-one, le 3,17-disulfate de 5 α androstane 3 β , 17 β -diol, le 21-monosulfate de cortexone et le 21-monosulfate de cortisone.

La fraction ester-sulfate II a été chromatographiée dans les systèmes I et II (p. 90) ainsi que les ester-sulfates de référence obtenus par synthèse.

Dans le système I, l'ester-sulfate II ne migre pas, mais il se sépare de nombreuses impuretés. Dans ce système, le 21-monosulfate de cortisone qui est le plus polaire des monosulfates de corticostéroïde a une vitesse de migration de 0,20 cm/h.

Après élution, l'ester-sulfate II est chromatographié dans le système II ainsi que les ester-sulfates de référence.

Les taches des ester-sulfates ont été repérées par les méthodes décrites page 32.

TABLEAU XLIV : R_f de l'ester-sulfates II par chromatographie sur papier

Ester-sulfates	SYSTEME n-acétate de butyle-n- butanol/ NH_4OH 4N (25-75/100)
	R_f
Ester-sulfate II	0.28
3,21-disulfate de pregna 5-ène 3β ,21-diol 20-one	0.27
3,17-disulfate de 5α -androstane 3β ,17 β -diol	0.32
21-monosulfate de cortisone	0.64
21-monosulfate de cortexone	0.78

On voit sur le *tableau XLIV* que la migration de l'ester-sulfate II est identique au sulfate le plus polaire de la 21-hydroxy-prégnénolone.

L'ester-sulfate II a été repéré dans le chromatogramme du système II par la réaction au bleu de méthylène.

Après solvolysé dans le chromatogramme (p. 28), d'une part l'ion sulfate libéré a été détecté par la réaction au rhodizonate de potassium (p. 32), et d'autre part le stéroïde a été détecté par la réaction au bleu de tétrazolium qui devient positive.

— *Electrophorèse sur papier* :

Une partie de la fraction ester-sulfate II a été soumise à une électrophorèse dans le tampon carbonate d'ammonium, pendant six heures, selon les conditions expérimentales indiquées page 79.

Le *tableau XLV* indique la migration du sulfate II et la migration d'autres ester-sulfates soumis aux mêmes conditions.

On remarque au *tableau XLV* que les disulfates de stéroïdes sont plus rapides que les mono-sulfates.

L'ester-sulfate II a une migration identique à l'ester-sulfate le plus polaire obtenu par action du complexe SO_3 -pyridine sur la 21-hydroxy-prégnénolone et elle est très voisine de celle du 3, 17-disulfate de 5α -androstane 3β , 17 β -diol.

La *figure 15* montre les différentes étapes de l'isolement de la fraction ester-sulfate II.

La formule que nous proposons pour le principal composant stéroïde de la fraction ester-sulfate est indiquée dans la *figure 16*.

TABLEAU XLV

Migration électrophorétique sur papier en cm/h de l'ester-sulfate II

Ester-sulfates	TAMPON : (NH ₄) ₂ CO ₃ 0.15 M
Ester-sulfate II	2.00
3,21-disulfate de pregna 5-ène 3β,21-diol 20-one	2.00
3,17-disulfate de 5α-androstane 3β,17β-diol	2.12
21-monosulfate de cortisone	1.10
21-monosulfate de cortexone	1.10
3α-monosulfate de pregnanolone	0.80
3α-monosulfate d'androstérone	1.20

DISCUSSION

L'identification du stéroïde isolé à partir de la fraction ester-sulfate II avec la 21 hydroxy-prégnenolone repose sur un ensemble de critères chimiques et physico-chimiques.

Il s'agit d'un stéroïde de faible polarité réduisant le bleu de tétrazolium ; il présente à l'état libre le même R_f que la 21-hydroxy-prégnenolone dans cinq systèmes chromatographiques différents et, après acétylation, dans deux autres systèmes chromatographiques.

Les systèmes les plus lents que nous avons utilisés ont permis d'éliminer notre hypothèse initiale sur son identité possible avec un des isomères de la tétrahydrocortexone, tous les isomères étudiés ayant dans ces systèmes une vitesse de migration supérieure à celle du stéroïde isolé. L'étude spectroscopique confirme son identité avec la 21-hydroxy-prégnenolone, montrant l'existence du groupement Δ₅ 3β hydroxy-stéroïde avec le réactif acide sulfurique-éthanol 2/1 (v + v) (maximum d'adsorption à 405 mμ).

La négativité de la réaction de PORTER et SILBER, et la production de formol après oxydation periodique, ainsi que la réduction du bleu de tétrazolium indiquent que ce stéroïde possède une chaîne α-cétolique.

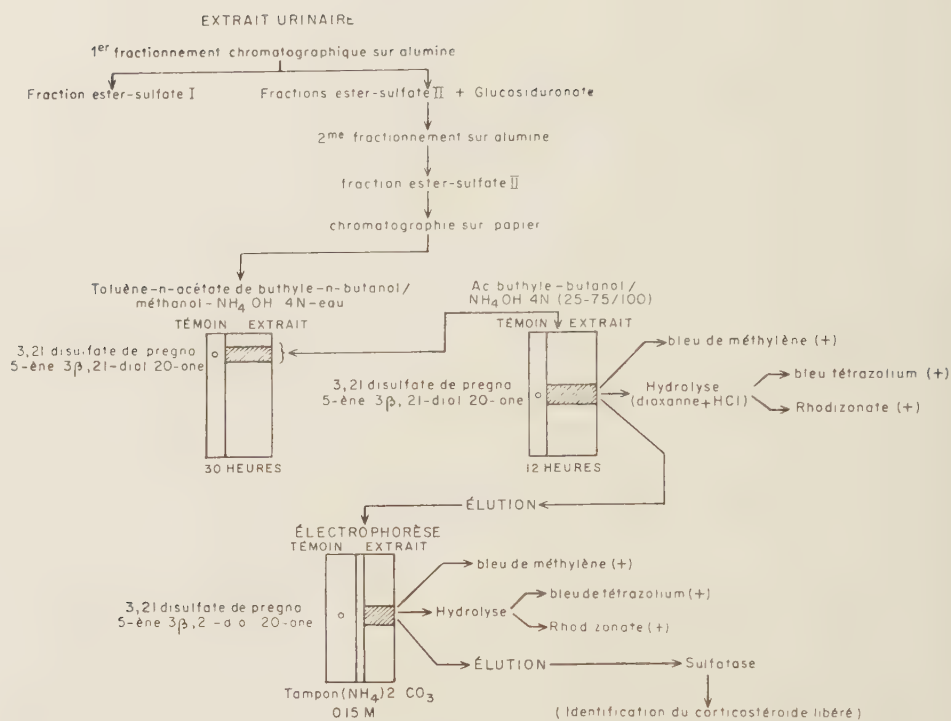


FIGURE 15

Identification du 3, 21-disulfate de pregna 5-ène 3 β , 21-diol 20-one dans l'urine humaine

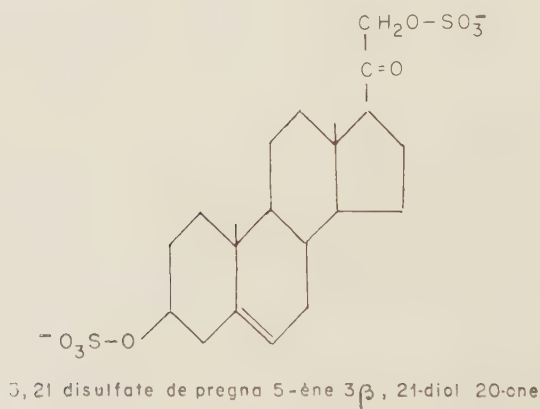


FIGURE 16

Formule proposée pour l'ester-sulfate II

La forme sous laquelle la 21-hydroxy-prégnenolone est excrétée dans les urines, présente toutes les propriétés des ester-sulfates. Ce composé, en effet, est extrait de sa solution aqueuse, en présence de bleu de méthylène, par le chloroforme (réaction de VLITOS) et il ne donne par de réaction des glucosiduronates. Il est hydrolysé par la sulfatase purifiée d'*Helix pomatia*. Ce conjugué est également solvolysé par une solution à 3 % d'acide trichloracétique dans le dioxane (COHEN et ONESON), ce qui est considéré comme spécifique des ester-sulfates. Enfin, il donne après solvolyse sur papier la réaction au rhodizonate caractéristique de l'ion sulfate.

On peut cependant éliminer l'hypothèse que ce conjugué soit un 3-mono-sulfate, car il ne réduit pas le bleu de tétrazolium avant hydrolyse (p. 80). Il ne peut être non plus un 21-mono-sulfate en raison du fait que sa polarité est très supérieure à celles du 21-mono-sulfates de corticostéroïdes, beaucoup plus polaires que la 21-hydroxy-prégnenolone. En revanche, il existe plusieurs arguments très forts en faveur de sa double conjugaison à l'acide sulfurique : ce conjugué est beaucoup plus polaire que tous les mono-sulfates de corticostéroïdes connus tant par chromatographie d'adsorption que par chromatographie sur papier. Dans le système chromatographique II du texte (p. 90), son R_f est voisin de celui du 3, 17 disulfate de 5 α -androstane 3 β , 17 β -diol de synthèse.

Comme l'a établi CAVINA [7], les disulfates de stéroïdes ont, par électrophorèse, une migration plus rapide que les mono-sulfates de stéroïdes. Nous avons confirmé ce fait ; en effet, les différents mono-sulfates dont nous disposions avaient une migration électrophorétique deux fois moins rapide que celle du 3, 17 disulfate d'androstanediol.

Quant au sulfate de 21-hydroxy-prégnenolone, isolé des urines, sa vitesse de migration était très proche de celle du disulfate d'androstanediol.

Pour toutes ces raisons, nous considérons que le sulfate de 21-hydroxy-prégnenolone que nous avons isolé des urines est le 3, 21 disulfate.

Une dernière preuve dont nous disposons, est que ce sulfate de 21-hydroxy-prégnenolone présente dans les systèmes chromatographiques étudiés, ainsi que par électrophorèse, une vitesse de migration analogue à celle de l'ester-sulfate le plus polaire que nous avons obtenu par action du SO_3 -pyridine sur le 21-hydroxy-prégnenolone de synthèse.

Dans nos recherches antérieures, nous avons constaté que les 3 β -hydroxy-stéroïdes étaient excrétés dans les urines sous forme de sulfoconjugués [9] et que la corticostérone et le cortisol étaient excrétés en grande partie sous forme de 21-sulfate [10, 11]. Un composé

possédant simultanément un hydroxyle en position 3β et un hydroxyle en C_{21} possède donc une structure privilégiée lui permettant une double sulfoconjugaison.

En conclusion, on peut dire avec une quasi-certitude que l'ester-sulfate polaire, isolé des urines de sujets ayant reçu de l'ACTH, est le 3, 21 disulfate de 21-hydroxy-prégnénolone.

EXCRÉTION URINAIRE DU 3, 21 DISULFATE
DE LA 21-HYDROXY-PRÉGNÉNOLOLE APRÈS ADMINISTRATION
DE 21-HYDROXY-PRÉGNÉNOLOLE 21-MONOACÉTATE

Nous avons administré 270 mg de 21-monoacétate de 21-hydroxy-prégnénolone * en 3 prises de 90 mg en 6 heures à un sujet normal ; les urines ont été recueillies pendant les 24 heures suivant la première prise et extraites par la méthode d'EDWARDS et coll. (p. 24). Une partie aliquote de l'extrait urinaire a été hydrolysée par le suc digestif d'*Helix pomatia* et nous avons trouvé après extraction par le dichlorométhane la quantité de 3 000 μ g de 21-hydroxy-prégnénolone dans la totalité des urines recueillies (24 h).

Les stéroïdes libres ont été extraits par le dichlorométhane et les corticostéroïdes conjugués fractionnés sur alumine. Sur les premiers éluats des glucosiduronates que contiennent les ester-sulfates II, nous avons pratiqué une deuxième chromatographie sur alumine (p. 89) et nous avons constaté une augmentation des ester-sulfates II. Ce conjugué avait le même comportement que le 3, 21 disulfate de 21-hydroxy-prégnénolone obtenu par synthèse, tant par chromatographie sur papier que par électrophorèse. Après hydrolyse par la sulfatase, nous avons mis en évidence un seul stéroïde réduisant le bleu de tétrazolium et ayant le même comportement que la 21-hydroxy-prégnénolone dans le système toluène/propanediol.

Nous avons trouvé 2 800 μ g/24 h de 21-hydroxy-prégnénolone dans la fraction ester-sulfate II, c'est-à-dire que les 95 % de la 21-hydroxy-prégnénolone trouvés dans les urines sont à l'état de disulfate.

Nous n'avons pas trouvé de 21-hydroxy-prégnénolone à l'état libre ni glucuroconjugué ; les 5 % restant sont probablement conjugués comme un mono-sulfate.

Avec cette expérience, nous avons confirmé nos données antérieures qui ont montré que la 21-hydroxy-prégnénolone était excrétée dans les urines à l'état de 3, 21-disulfate.

(*) Nous remercions vivement le Professeur W. KLYNE de nous avoir procuré la 21-hydroxyprégnénolone 21-monoacétate.

III — Identification du glucosiduronate de 5β -prégnane 3α , 21-diol 20-one dans l'urine humaine

Dans le but d'étudier les métabolites de la cortexone et leur mode de conjugaison, nous avons administré 50 mg de ce corticostéroïde à un sujet normal, par voie orale, en trois prises pendant 12 h. Les urines de 24 h après le début de l'expérience ont été recueillies.

1) *Extraction et fractionnement*

Les urines ont été extraites par la méthode d'EDWARDS et coll. (p. 24). Après extraction par le dichlorométhane des corticostéroïdes libres, les corticostéroïdes conjugués sont fractionnés en ester-sulfates et glucosiduronates sur colonne d'alumine (p. 24).

2) *Systèmes chromatographiques utilisés*

a) CORTICOSTÉROÏDES LIBRES

- 1) Toluène/propanediol.
- 2) Isooctane/méthanol-eau (5/3-2).

b) ACÉTATES DE CORTICOSTÉROÏDES PEU POLAIRES

Les acétates de corticostéroïdes peu polaires ont été chromatographiés par chromatographie sur papier sans phase stationnaire, selon la méthode qui est exposée page 108, en utilisant comme solvant :

- 3) Lignoïne (Eb. 65-85°C).
- 4) Isooctane.

c) GLUCOSIDURONATE DE CORTICOSTÉROÏDES

- 5) Toluène-acétate de butyle-butanol/acide acétique glacial-eau-méthanol (40-50-10)/(5-45-60).

d) ELECTROPHORÈSE

Les glucosiduronates sont dissous dans l'éthanol et placés sur des bandes de papier WHATMAN n° 1, dans l'appareil du type GRASSMAN et HANNIG 0,15 M et selon les conditions indiquées page 79.

3) Révélation et détection des glucosiduronates

Les glucosiduronates ont été révélés sur le chromatogramme par le réactif acide acétique/acide sulfurique 9/1 (v + v) [7] et après élution ont été détectés par la réaction à la naphtorésorcine-acide sulfurique [8].

4) Etude de la fraction glucosiduronate

La fraction des glucosiduronates provenant de la séparation chromatographique sur alumine a été purifiée par chromatographie de partage sur célite * en utilisant les solvants indiqués dans le système 5. Les glucosiduronates de l'extrait urinaire sont chromatographiés sur colonne de 30 g de célite mélangée avec 23 ml de solvants acide acétique-eau-méthanol et élués avec 500 ml du mélange : toluène-acétate de butyle-butanol.

Après détection des glucosiduronates par la réaction de TOLLENS [8], les fractions correspondantes sont mélangées et évaporées à sec et chromatographiées sur papier dans le système 5.

Le chromatogramme est fractionné en 5 parties et la fraction correspondant au glucosiduronate le moins polaire est éluee par l'éthanol à 50 %. La migration de ce glucosiduronate par rapport à celle du glucosiduronate de tétrahydrocortisone ** (G-THE) dans ce système est de : $R_{G-THE} = 2,70$.

Les taches de glucosiduronate ont été révélées par la réaction de CAVINA [7] et les corticostéroïdes par la réaction au bleu de tétrazolium après hydrolyse.

Les éluats provenant de plusieurs chromatographies sont évaporés à sec et soumis à une électrophorèse selon les conditions indiquées ci-dessus.

La migration du glucosiduronate du corticostéroïde peu polaire s'est avérée identique à la migration du glucosiduronate de THE et égale à 0,8 cm/h.

La figure 17 montre les différentes étapes suivies pour l'isolement du glucosiduronate de tétrahydrocortexone.

(*) Purification de la célite : 500 g de célite DIC.S (clarcel ceca) sont chauffés à 400°C pendant quatre heures. Après refroidissement, on les laisse pendant une nuit à l'action de l'acide chlorhydrique concentré, on la lave par l'eau distillée jusqu'à neutralisation, puis par l'éthanol et par le dichlorométhane. La célite est séchée et laissée pendant quarante-huit heures à l'étuve à 120°C.

(**) Nous remercions vivement le Docteur J.J. SCHNEIDER de nous avoir aimablement procuré le glucosiduronate de tétrahydrocortisone de synthèse.

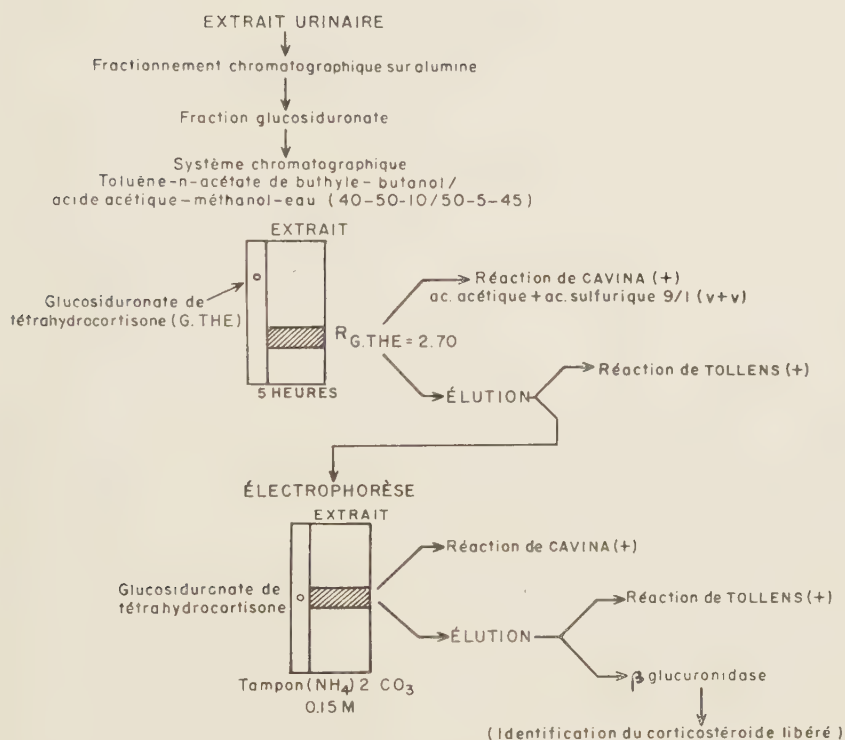


FIGURE 17

Identification du glucosiduronate de 5β prégénane 3α , 21-diol 20-one dans l'urine humaine

5) Identification du corticostéroïde

L'éluat du chromatogramme provenant de l'électrophorèse a été hydrolysé par la β -glucuronidase, purifié après extraction par le dichlorométhane et, enfin, chromatographié sur papier dans les systèmes 1 et 2 (p. 103). Il contenait une seule tache réduisant le bleu de tétrazolium, son R_f est comparé avec trois isomères de la THDOC (tableau XLVI).

Comme il est indiqué dans le tableau XLVI, nous n'avons trouvé qu'une seule tache réduisant le bleu de tétrazolium dans la zone de migration des isomères équatoriaux de la THDOC.

Après acétylation, les acétates de corticostéroïdes sont chromatographiés selon la méthode décrite page 108, en utilisant comme témoin les deux diacétates isomères équatoriaux de la THDOC, le résultat est indiqué dans le tableau XLVII.

TABLEAU XLVI : R_f du stéroïde obtenu à partir de l'extrait urinaire et de trois isomères de la THDOC dans deux systèmes chromatographiques différents

Stéroïdes	SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES	
	Toluène/propanediol	Isooctane/méthanol-eau (5/3-2)
	R_{THDOC}	R_{THDOC}
Stéroïde (extrait urinaire)	1	1
5 α -pregnane 3 β ,21-diol 20-one	0.85	0.88
5 β -pregnane 3 α ,21-diol 20-one (THDOC)	1	1
5 β -pregnane 3 β ,21-diol 20-one	1.25	1.66

D'après les résultats du *tableau XLVII*, nous pouvons déduire que le stéroïde isolé correspond à l'isomère de la THDOC de structure équatoriale 3 α , 5 β .

TABLEAU XLVII

R_f de l'acétate du stéroïde obtenu avec les deux isomères équatoriaux de la THDOC (chromatographie d'adsorption sur papier)

Acétate de Stéroïde	SOLVANTS	
	Ligroïne $R_{diac.THDOC}$	Isooctane $R_{diac.THDOC}$
Acétate de stéroïde (extrait urinaire)	1	1
3,21-diacétate de 5 α -pregnane 3 β ,21-diol 20-one	0.60	0.58
3,21-diacétate de 5 β -pregnane 3 α ,21-diol 20-one	1	1

Les propriétés physico-chimiques du stéroïde isolé sont indiquées dans le *tableau XLVIII*, ainsi que celles du 5 β -prégnane 3 α , 21-diol 20-one (THDOC).

TABLEAU XLVIII

*Propriétés physico-chimiques du stéroïde isolé
et celles du 5 β -prégnane 3 α , 21-diol 20-one (THDOC)*

Réactions de caractérisation	Stéroïde (extrait urinaire)	5 β -pregnane 3 α , 21-diol 20-one (THDOC)
Réaction au bleu de tétrazolum	Positive	Positive
Réaction de Porter et Silber	Négative	Négative
Réaction de Zimmermann	Négative	Négative
Absorption à 254 m μ	Négative	Négative
Fluorescence en milieu sodique (lumière de Wood)	Négative	Négative
Maximum d'absorption à l'acide sulfurique concentré (m μ) $\left(\begin{array}{l} 1\% \text{ mg/ml} \\ E_{1 \text{ cm}} \end{array} \right)$	320	320

6) *Spectre infra-rouge*

Le spectre infra-rouge du stéroïde isolé du glucosiduronate purifié sur gel de silice, présentait les mêmes bandes d'absorption dans la région du spectre située entre 900 et 1900 cm⁻¹, que le stéroïde 5 β -prégnane 3 α , 21-diol 20-one de synthèse.

7) *Evaluation quantitative*

La quantité de THDOC évaluée avec la réaction au bleu de tétrazolum est de 2 100 μ g/24 h.

— *Fraction ester-sulfate :*

Une étude identique a été réalisée avec la fraction ester-sulfate provenant de la séparation sur alumine. Après hydrolyse de cette fraction par la sulfatase, nous n'avons pas trouvé de cortexone, ni aucun de ses métabolites di- ou tétrahydrogénés.

— *Fraction libre :*

Nous avons identifié dans les systèmes 1 et 2 (p. 103) et dans les solvants 3 et 4 après acétylation, le 5 β -prégnane 3 α , 21-diol 20-one

(THDOC). Nous n'avons pas trouvé d'autres isomères, ni de dérivés dihydrogénés, ni de cortexone dans cette fraction. La quantité évaluée par la réaction au bleu de tétrazolium est de 300 $\mu\text{g}/24\text{ h}$.

Le *tableau IL* montre la répartition de la cortexone et de ses métabolites dans les trois fractions étudiées.

TABLEAU IL : *Distribution urinaire de la cortexone et ses métabolites di- et tétrahydrogènes dans les différentes fractions après administration de 50 mg de cortexone*

FRACTIONS	Cortexone $\mu\text{g}/24\text{ h}$	DHDOC $\mu\text{g}/24\text{ h}$	THDOC $\mu\text{g}/24\text{ h}$
Libres	0	0	300
Glucosiduronate	0	0	2100
Ester-sulfate	0	0	0

DHDOC = dihydrocortexone — THDOC = tétrahydrocortexone

CONCLUSION

En conclusion, le glucosiduronate de 5β -prégnane 3α , 21-diol 20-one a été identifié comme le métabolite principal après administration de cortexone par voie orale ; une faible partie de tétrahydrocortexone a été détectée à l'état libre ; ce stéroïde n'a pas été mis en évidence dans la fraction ester-sulfate.

Chromatographie d'adsorption sur papier des acétates de stéroïdes

Les mono- et les diacétates des stéroïdes di- ou trioxycgénés ne peuvent être séparés dans les systèmes aussi lents que : méthylcyclohexane/propanediol, ligroïne/méthanol-eau (2/1-1), heptane/propanediol, triméthyl 2-2-4 pentane/méthanol-eau (2/1-1), car l'expérience prouve qu'ils migrent avec le front du solvant ou au voisinage de celui-ci, c'est ainsi que nous n'avons pas réussi à séparer les acétates des isomères du 5 ξ -prégnane 3 ξ , 21-diol 20-one dans ces systèmes.

Il en est de même pour les acétates de stéroïdes dioxycgénés en C₁₉.

La difficulté de la séparation des acétates de stéroïdes des isomères peu polaires nous a amené à les déposer sur du papier WHATMAN n° 1 non imprégné par une phase stationnaire, et à tenter leur séparation en faisant passer les solvants suivants : ligroïne, heptane, triméthyl 2-2-4 pentane, méthylcyclohexane et décaline. Cela revenait, en fait, à utiliser le papier comme un adsorbant et à réaliser une véritable chromatographie d'adsorption avec des solvants peu polaires.

Les acétates des stéroïdes utilisés dans ce travail sont :

— 4 diacétates de stéroïdes trioxycgénés * :

- 1) 5 β -prégnane 3 α , 21-diol 20-one ;
- 2) 5 α -prégnane 3 β , 21-diol 20-one ;
- 3) 5 β -prégnane 3 β , 21-diol 20-one ;
- 4) préigna 5-ène 3 β , 21-diol 20-one.

— 5 monoacétates de stéroïdes dioxycgénés :

- 5) 5 α -androstane 3 α -ol 17-one ;
- 6) 5 β -androstane 3 α -ol 17-one ;
- 7) 5 α -androstane 3 β -ol 17-one ;
- 8) 5 β -androstane 3 β -ol 17-one ;
- 9) androsta 5-ène, 3 β -ol 17 one.

MODE OPÉRATOIRE

1) *Acétylation*

La méthode d'acétylation des différents stéroïdes a été indiquée page 31.

(*) Le stéroïde 5 β -prégnane 3 α , 21-diol 20-one a été envoyé par le Docteur W. TAYLOR, le stéroïde 5 α -prégnane 3 β , 21-diol 20-one par le Docteur A. ZAFARONI, le stéroïde 5 β -prégnane 3 β , 21-diol 20-one par le Docteur S.K. FIGDOR et le préigna 5-ène 3 β , 21-diol 20-one par le Docteur W. KLYNE. Nous les remercions vivement.

2) Dépôt des acétates de stéroïdes

Dans nos premières expériences, nous avons dissous les acétates dans l'éthanol et nous avons constaté qu'une grande partie demeurait sur la ligne de départ.

Ce phénomène se produisait en faible quantité si les acétates sont déposés avec le mélange acétone/acétate d'éthyle 1/1 v/v.

Nous avons réussi à chromatographier la totalité du dépôt en procédant de la façon suivante : au niveau de la ligne de départ, le papier est imbibé avec un mélange de méthanol/propanediol 2/1 v/v sur une hauteur de 2 cm et l'acétate est déposé dans cette région de sorte qu'on a au démarrage une chromatographie de partage à laquelle succède une chromatographie d'adsorption sur le papier.

On dépose de 3 à 8 μg de chaque acétate dans 4-10 μl . Les cuves sont équilibrées avec les différents solvants pendant 24 h à $24^\circ\text{C} \pm 1$.

La chromatographie descendante se poursuit selon les cas pendant 3 à 4 h pour les quatre premiers solvants et pendant 8 h pour la décaline.

Les réactions suivantes sont utilisées pour la détection des taches :

- a) réaction au bleu de tétrazolium pour les stéroïdes α -céto-liquides ;
- b) réaction de ZIMMERMANN pour les 17-cétostéroïdes.

RESULTATS

Nous n'avons pas constaté de trainée pour les différents acétates lorsque les quantités chromatographiées sont de 3 à 10 μg ; la tache est circulaire, ayant un diamètre de 1,5 à 3 cm.

Le tableau L donne les résultats de la chromatographie pour cinq solvants utilisés avec trois isomères de diacétates de tétrahydrodésocorticostérone : 5β -prégnane 3α , 21-diol 20-one (THDOC), 5β -prégnane 3β , 21-diol 20-one (5β , 3β THDOC), 5α -prégnane 3β , 21-diol 20 one (5α , 3β THDOC) et le prégn-5-ène 3, 21-diol 20 one.

On constate que les deux stéroïdes isomères ayant un hydroxyle équatorial sont nettement séparés dans ces systèmes ; le stéroïde de structure 3α , 5β est moins polaire que l'isomère 5β , 5α .

Les vitesses de migration des stéroïdes de structure 3β , 5β (axiale), 3β , 5α (équatoriale) et du stéroïde non saturé 5β , Δ_5 sont très voisines.

TABLEAU L

Chromatographie d'adsorption sur papier de quatre diacétates isomères dans différents solvants

Diacétate	Structure	SOLVANTS				
		Ligroïne	Heptane	Méthylcyclohexane	Triméthylpentane	Décane
		$R_{\text{diacét. THDOC}}$				
THDOC	3 α ,5 β	1(8cm/h)	1(9cm/h)	1(7,5cm/h)	1(4cm/h)	1(3,5cm/h)
5 β ,3 β -THDOC	3 β ,5 β	0.56	0.55	0.85	0.52	0.77
5 α ,3 β -THDOC	3 β ,5 α	0.54	0.59	0.82	0.50	0.75
Pregna 5-ène 3 β ,21-diol 20-one	3 β , Δ_5	0.58	0.55	0.77	0.51	0.69

Le tableau LI indique les résultats obtenus dans les différents solvants avec les mono-acétates des 17-cétostéroïdes suivants : androstérone (5 α -androstane 3 α -ol, 17-one), épiandrostérone (5 α -androstane 3 β -ol, 17-one), étiocolanolone (5 β -androstane 3 α -ol, 17-one) et déhydro-épiandrostérone (androsta 5-ène 3 β -ol, 17-one).

TABLEAU LI

Chromatographie d'adsorption sur papier de cinq monoacétates isomères dans différents solvants

Monoacétates	Structure	SOLVANTS				
		Ligroïne	Méthylcyclohexane	Heptane	Décane	Triméthylpentane
		$R_{\text{étiocolanolone-monoacétate}}$				
Androstérone	3 α ,5 α	0.97	1.03	0.98	0.97	0.91
Etiocolanolone	3 α ,5 β	1(8cm/h)	1(9cm/h)	1(6cm/h)	1(3cm/h)	1(5cm/h)
Epiandrostérone	3 β ,5 α	0.72	0.85	0.73	0.79	0.51
3 β -étiocolanolone	3 β ,3 β	0.73	0.83	0.85	0.80	0.59
Déhydroépiandrostérone	3 β , Δ_5	0.69	0.79	0.84	0.80	-

On constate le même phénomène que précédemment, à savoir que les deux isomères ayant un hydroxyle équatorial sont bien séparés l'une de l'autre. Le stéroïde de structure 3β , 5α est plus polaire que son isomère 3β , 5β . Les deux isomères axiaux sont également bien séparés l'une de l'autre *.

La migration de l'acétate du stéroïde de structure 3β , 5α est voisine de celle de son isomère 3β , 5β et de celle de l'acétate de déhydro-épiandrostérone (3β , Δ_5).

La migration de l'acétate du stéroïde de structure 3α , 5α est voisine de celle de son isomère 3α , 5β .

DISCUSSION

Les résultats précédents indiquent qu'il est possible de réaliser sur une feuille de papier WHATMANN n° 1, une chromatographie d'adsorption qui est assez lente pour séparer des substances aussi peu polaires que les mono-acétates de stéroïdes dioxygénés et les diacétates des stéroïdes trioxygénés, pour lesquelles les systèmes habituels ne conviennent pas.

TABLEAU LII

Chromatographie de partage sur papier de quatre isomères dans cinq systèmes différents

Stéroïde	SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES				
	Ligroïne/ propenediol R_{THDOC}	Heptane/ formamide R_{THDOC}	Tétréline/ propenediol R_{THDOC}	Décaline/ propenediol R_{THDOC}	Décaline/ méthanol-eau R_{THDOC}
THDOC	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
$5\alpha, 3\beta$ -THDOC	0.92	0.85	0.94	0.87	1.17
$5\beta, 3\beta$ -THDOC	1.66	1.83	1.17	1.91	2.00
Pregna 5-ène $3\beta, 21$ -diol 20-one	0.68	0.65	0.84	0.62	0.93

(*) Nous avons confirmé la séparation des acétates des isomères axiaux en 3α -OH et en 3β -OH et les acétates des isomères équatoriaux en 3α -OH et en 3β -OH dans les séries du 5ξ -androstane 3ξ , 17β -diol et dans la série du 5ξ -prégnane 3ξ , 17α , 20β -triol.

Il est intéressant de comparer l'ordre de migration des acétates des isomères de la THDOC dans notre méthode (*tableau L*) avec l'ordre de migration des mêmes stéroïdes libres dans les différents systèmes de chromatographie de partage (*tableau LII*).

Nous pouvons faire les remarques suivantes :

1° La migration de l'isomère 3β , 5β par rapport à celle de l'isomère 3α , 5β est inversée dans les deux systèmes. En chromatographie de partage, l'isomère 3α , 5β est plus polaire que l'isomère 3β , 5β à l'état libre, alors que dans les systèmes d'adsorption pour les acétates c'est le stéroïde de structure 3β , 5β qui est plus polaire que son isomère 3α , 5β .

2° En chromatographie de partage des stéroïdes libres, il est difficile, voire impossible, de séparer les deux isomères axiaux et les deux isomères équatoriaux l'un de l'autre. Dans la méthode proposée, on obtient une bonne séparation des acétates correspondant aux deux isomères axiaux et aux deux isomères équatoriaux.

3° En revanche, dans la méthode décrite, l'isomère 3β , 5β et l'isomère 3β , 5α à l'état d'acétate ont une migration très voisine, de même les isomères 3α , 5α et 3α , 5β ; c'est le contraire dans le cas de la chromatographie de partage des stéroïdes libres.

Le schéma suivant montre la différence de polarité des stéroïdes axiaux et équatoriaux à l'état libre et acétylé.

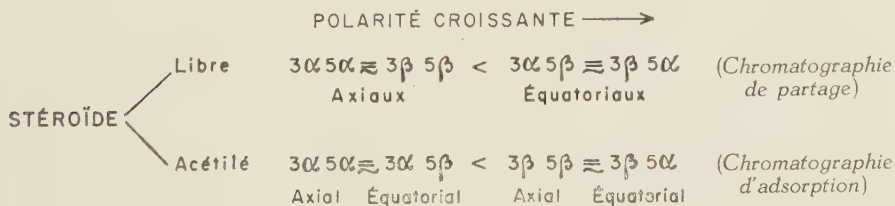


Schéma 4 : Variation de polarité
du stéroïde libre et acétylé

CONCLUSION

En utilisant une méthode de chromatographie d'adsorption sur feuille de papier pour monoacétates et diacétates de stéroïdes peu polaires, on obtient des R_f qui sont plus faibles que ceux des systèmes de chromatographie de partage les plus lents. En outre, les vitesses de migration relatives des diacétates de différents stéroïdes sont très

différentes de celles que l'on trouve dans les systèmes de chromatographie de partage.

En associant la chromatographie de partage de stéroïdes libres à la chromatographie d'adsorption sur papier de leurs acétates, on dispose d'un moyen qui permet de séparer et par suite d'identifier des stéroïdes isomères ayant un hydroxyle axial ou équatorial.

Dans une première étape, on sépare par chromatographie de partage dans des systèmes appropriés les isomères axiaux (3α , 5α et 3β , 5β) des isomères équatoriaux (3α , 5β et 3β , 5α). Dans une deuxième étape, ces stéroïdes sont acétylés et leurs acétates sont à nouveau chromatographiés dans les systèmes d'adsorption sur papier, ce qui permet la séparation des deux isomères de chaque catégorie.

BIBLIOGRAPHIE

1. SOBEL (A.), SPOERRI (P.E.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1941, **63**, 1259.
 2. MILLER (F.A.) and WILKINS (C.H.). — *Ana. Chem.*, 1952, **24**, 1255.
 3. CAVINA (G.) et TENTORI (L.). — *Clin. Chim. Acta*, 1958, **3**, 160.
 4. LEWBART (M.L.) et SCHNEIDER (J.J.). — *Nature*, 1955, **176**, 1175.
 5. GRASSMANN (W.) and HANNIG (K.). — *Physiol. Chem.*, 1952, **1**, 290.
 6. OERTEL (G.W.) and EIK-NES. — *Ana. Chem.*, 1959, **28**, 31.
 7. CAVINA (G.). — *Rend. Inst. Sup. Sanita (Roma)*, 1957, **20**, 923.
 8. TOLLENS (B.). — *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, 1908, **41**, 1788.
 9. JAYLE (M.F.). — *Thérapie*, 1958, **13**, 37.
 10. PASQUALINI (J.R.). — *Compt. Rend. Ac. Sc.*, 1960, **250**, 3892.
 11. PASQUALINI (J.R.). — *Compt. Rend. Ac. Sc.*, 1960, **251**, 1236.
 12. COLTHUP (N.B.). — *J. Opt. Soc. Amer.*, 1950, **40**, 397.
 13. HASZELDINE (R.N.) and KIDD (J.M.). — *J. Chem. Soc.*, 1954, IV, 4228.
-

**Isolement dans l'urine humaine
d'un Δ_4 3-CO stéroïde
donnant naissance à une lactone
par oxydation**

Au cours de l'étude sur les modes de conjugaison des cortico-stéroïdes urinaires dans les extraits obtenus après administration d'ACTH, nous avons étudié la forme de conjugaison de l'aldostérone.

Ces résultats ont montré une augmentation de 4-5 fois la valeur normale de l'aldostérone dans la fraction glucosiduronate, en appliquant la méthode chromatographique de NEHER et WETTSTEIN [1].

Nous nous sommes demandés si la totalité de ce stéroïde était bien constituée par l'aldostérone.

A cet effet, nous avons pratiqué une troisième chromatographie dans le système isooctane/butanol tertiaire-eau (10/5-9) et nous avons constaté que son R_f était de 1,85 par rapport à celui de l'aldostérone [2].

Nous avons alors entrepris une étude en vue de l'identification de cette substance que nous avons dénommée stéroïde X_1 .

1) *Matériel biologique*

Nous sommes partis d'un mélange de plusieurs litres provenant de sujets exempts d'affection de la corticosurrénale, qui avaient reçu 40 unités d'ACTH phosphate-Zn en deux injections faites à douze heures de distance.

2) *Extraction*

Les urines ont été extraites par la méthode d'EDWARDS et collaborateurs (p. 24).

Les corticostéroïdes ont été extraits par le dichlorométhane.

3) *Fractionnement des corticostéroïdes conjugués*

Les corticostéroïdes conjugués ont été fractionnés en fraction ester-sulfates et glucosiduronates (p. 24).

4) *Hydrolyses de glucosiduronates*

Les glucosiduronates ont été hydrolysés par une préparation purifiée de β -glucuronidase, pendant 48 heures à 37°C et à pH 4,7 (p. 27).

5) *Purification*

Après extraction des corticostéroïdes libérés par la β -glucuronidase, ils ont été purifiés sur florisil (p. 28).

6) *Chromatographie sur papier*

Comme la fraction hydrolysée contenait une grande quantité de corticostéroïdes, nous avons dû procéder à un grand nombre de chromatographies sur papier, en développant dans chaque chromatogramme la quantité correspondante à 1 mg de corticostéroïdes réduisant le bleu de tétrazolium (en équivalent de cortisol).

L'extrait a été d'abord chromatographié dans le système chloroforme/formamide, et nous avons séparé la région ayant une migration identique à celle de la cortisone ou de l'aldostérone.

La région de la cortisone de plusieurs chromatogrammes réunis a été rechromatographiée dans le système acétate d'éthyle-toluène/méthanol-eau (10-9)/(5-5) contre un standard de cortisol et de cortisone. Dans ce système, l'aldostérone a une migration identique à celle du cortisol.

Cette chromatographie permet de séparer le stéroïde X_1 de la cortisone et également de traces de tétrahydrocorticostérone (THB) et de tétrahydro 17 α -hydroxycortexone (THS), qui ont été éluées du système chloroforme/formamide dans la région de la cortisone.

Il ressort de cette étude chromatographique que le stéroïde X_1 a dans ces deux systèmes la même migration que l'aldostérone.

En dépit de cette analogie, on constate cependant une différence entre le comportement de l'aldostérone et celui du stéroïde X_1 à l'égard des réactions utilisées pour leur détection sur le chromatogramme, le stéroïde X_1 comme l'aldostérone nous a donné une fluorescence positive en milieu sodique, ce qui est l'indice de la présence d'une fonction Δ_1 3-CO. Alors que l'aldostérone donne une réaction rapide et intense avec le bleu de tétrazolium, notre substance au contraire développe lentement cette réaction ; si bien que pour une quantité de stéroïde

donnant la même intensité de fluorescence, la quantité de bleu de formazan formé était notablement différente.

Nous avons alors chromatographié ce composé dans le système isooctane/butanol tertiaire-eau (10/5-9) parallèlement à un standard d'aldostérone, nous avons constaté que dans ce système, contrairement au précédent, le stéroïde X_1 était beaucoup moins polaire, le rapport de migration étant égal à 1,85 [2].

La preuve était donc faite que ce stéroïde provenant de l'hydrolyse de la fraction glucosiduronate n'était pas de l'aldostérone. Il est bien établi que l'aldostérone n'est pas un glucuro-conjugué, mais qu'elle est excrétée dans les urines sous la forme d'un conjugué inconnu labile, qui est hydrolysé à pH 1 à la température du laboratoire [3, 4].

Le *tableau LII* donne les résultats, dans différents systèmes chromatographiques, de la cortisone, du cortisol, de l'aldostérone du stéroïde X_1 et de la 18-hydroxy 11-déhydrocorticostérone.

On voit que dans trois systèmes (chloroforme/formamide ; toluène-ac. éthyle/méthanol-eau (9-1/5-5) et benzène/méthanol-eau (10/5-5) l'aldostérone et le stéroïde X_1 ont une migration identique ou très voisine, alors que dans le système isooctane/butanol tertiaire-eau (10/5-9) le stéroïde X_1 est moins polaire que l'aldostérone et que dans le système toluène/propanediol c'est le stéroïde X_1 qui est plus polaire.

En partant de 6 litres d'urines, nous avons obtenu environ 800 μ g du stéroïde X_1 , calculé en considérant : la densité optique au maximum d'absorption à 239 m μ , en donnant au coefficient d'extinction moléculaire (ϵ) la valeur de 15 800 et au composé étudié un poids moléculaire hypothétique de 350.

Nous avons appliqué différentes micro-réactions chimiques à l'aldostérone, au stéroïde X_1 et à la 18-hydroxy 11-déhydrocorticostérone, elles sont indiquées au *tableau LIV*.

Il est à souligner que les trois stéroïdes sont formaldéhydogènes, ce qui indique l'existence d'une fonction oxygénée en C_{20} et en C_{21} .

Nous avons constaté que la 18-hydroxy 11-déhydrocorticostérone donne la réaction de PORTER et SILBER qui, on le sait, est caractéristique de la chaîne latérale 17 α , 21-dihydroxy 20-cétonique.

7) Acétylation du stéroïde X_1

Nous avons acétylé avec le mélange anhydride acétique pyridine le stéroïde X_1 , l'aldostérone et la 18-hydroxy 11-déhydrocorticostérone, et nous avons comparé leur migration dans les systèmes hexane-benzène (1-1)/propanediol et isooctane/méthanol-eau (5/3-2), les résultats sont indiqués au *tableau LV*.

TABLEAU LIII

R_f du stéroïde X₁ dans différents systèmes chromatographiques

Stéroïdes	SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES				
	Chloroforme/ formamide	Toluène-ac-éthyle/ méthanol-eau (9-1/5-5)	Isooctane/ butanol tertiaire-eau (10/5-9)	Toluène/ propanediol	Benzène/ méthanol-eau (10/5-5)
	R _{cortisone} 1	R _{cortisone} 1	R _{cortisone} 1	R _{cortisone} 1	R _{cortisone} 1
Cortisone (E)					
Cortisol (F)	0.36	0.64	0.81	0.40	0.60
Composé X ₁	1.02	0.65	1.13	0.57	0.72
Aldostérone	0.98	0.65	0.60	1.05	0.79
18-hydroxy-11-dehydro- corticostérone	0.95	0.66	0.59	•	0.76

TABLEAU LIV : Réactions de caractérisation du stéroïde X_1 , de l'aldostérone et de la 18-hydroxy 11-déhydroaldostérone

Propriétés physico-chimiques	Composé X_1	Aldostérone	18-hydroxy-11-déhydro-corticostérone
Réaction bleu tétrazolium	Faiblement positive	Positive	Faiblement positive
Réaction de Porter et Silber	Négative	Négative	Positive
Réaction de Zimmermann	Négative	Négative	Négative
Maximum d'absorption en milieu éthanolique (m μ) 1 % mg/ml E 1 cm	239	240	240
Absorption à 254 m μ	Positive	Positive	Positive
Fluorescence en milieu sodique (lumière de Wood)	Positive	Positive	Positive
Formol dégagé par oxydation périodique	Positive	Positive	Positive
Maximum d'absorption en milieu sulfurique (m μ) 1 % mg/ml E 1 cm	298	280	284

TABLEAU LV : R_f de l'acétate du stéroïde X_1 , du diacétate de l'aldostérone, de l'acétate de 18-hydroxy 11-déhydrocorticostérone, et de l'acétate de la 18-hydroxy-cortexone

ACETATE STEROIDE	SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES	
	Hexane-benzène (1-1)/propanediol $R_{\text{diac. Aldost.}}$	isooctane/méthanol-eau (5/3-5) $R_{\text{diac. Aldost.}}$
Diacétate d'Aldostérone	1	1
Acétate 18-hydroxy 11-dehydrocorticostérone	0.25	-
Acétate du stéroïde X_1	0.40	0.80
Acétate 18 hydroxy-cortexone	0.63	1.60
Adrenostérone	0.78	2.00

Le fait que l'acétate de la 18-hydroxy 11-déhydrocorticostérone soit plus polaire que le diacétate de l'aldostérone laisse supposer que le dérivé obtenu est le monoacétate en C₂₁.

Nous avons réalisé l'acétylation pendant 48 heures sans obtenir un résultat différent.

L'acétate du stéroïde X₁ est plus polaire que l'acétate de l'aldostérone, ce qui pourrait être expliqué par la même raison que celle que nous avons présentée pour l'acétate de la 18-hydroxy 11-déhydrocorticostérone.

8) Oxydation du stéroïde X₁ par l'acide periodique

L'oxydation du stéroïde X₁ par l'acide periodique en milieu sulfurique (p. 39) donne naissance à une substance qui, chromatographiée dans le système hexane-benzène (1-)/propanediol, a une R_f = 1,14 par rapport à la migration de l'adrénostérone.

Le stéroïde provenant de l'oxydation de l'aldostérone dans le même système a un R adrénostérone = 0,84.

En revanche, l'aldostérone comme le composé X₁ dans ce même système a une migration pratiquement nulle.

On peut déduire donc, de ces deux essais, que l'oxydation par le periodate a pour conséquence de diminuer la polarité de l'aldostérone comme celui du composé X₁, ces deux corps ont le même comportement paradoxal puisqu'il est bien établi que les étioacides provenant de l'oxydation periodique de 17-désoxycorticostéroïdes (cortiscostérone (B), 11-déhydrocorticostérone (A), tétrahydrocorticostérone (THB), tétrahydro 11-déhydrocorticostérone (THA), etc.) sont tous plus polaires que les corticostéroïdes correspondants.

Dans le cas de l'aldostérone ce comportement paradoxal est expliqué par la lactonisation du carboxyle en C₂₀ avec l'hydroxyle semi-acétalique du C₁₈.

Nous avons donc émis l'hypothèse que le comportement analogue du composé X₁ après oxydation par le bismuthate ou par le périodate pourrait être également dû à la lactonisation de l'étioacide formé avec un hydroxyle.

On voit dans le *tableau LVI* que le dérivé d'oxydation de la 18-hydroxy 11-déhydrocorticostérone a la polarité la plus élevée, quant aux dérivés d'oxydation de l'aldostérone et de ce stéroïde X₁, leurs polarités sont inversées dans les deux systèmes étudiés.

N.B. : Nous remercions vivement les Docteurs SCHMIDLIN et WETTSTEIN de nous avoir procuré la 18-hydroxy 11-déhydrocorticostérone et la lactone 20 → 18 de l'acide Δ₄ 18-ol 3, 11-dione étiocholénique, le Docteur LABLER de nous avoir procuré la 18-hydroxyprogesterone et au Docteur R. PAPPO de nous avoir procuré la 18-hydroxy-cortexone.

— *Oxydation chromique :*

On obtient le même produit d'oxydation par action de l'acide périodique ou oxyde chromique pour l'aldostérone, la 18-hydroxy 11-déhydrocorticostérone et pour le stéroïde X_1 .

La 18-hydroxyprogesterone qui n'était pas oxydée par l'acide périodique, est oxydée par le CrO_3 en lactone 18 $\rightarrow$ 20 de l'acide 18-ol 3-one Δ_4 étiocholénique. Cette lactone a dans le système hexane-benzène (1-1)/propanediol une migration très voisine du produit d'oxydation du stéroïde X_1 comme il est indiqué au *tableau LVI*.

— *Spectre en milieu éthanolique :*

Le spectre du stéroïde X_1 , réalisé entre 220 et 500 $m\mu$, présentait un maximum d'absorption à 239 $m\mu$, qui est caractéristique de stéroïde ayant une fonction Δ_4 3-CO.

— *Spectre en milieu sulfurique :*

Le spectre du stéroïde X_1 , réalisé entre 220 et 550 $m\mu$, montre un maximum d'absorption très accusé à 298 $m\mu$.

— *Spectre infra-rouge :*

Le spectre infra-rouge du stéroïde X_1 présentait une bande d'absorption à 1 705 cm^{-1} qui est la caractéristique de la fonction cétonique en C_3 , C_{11} ou C_{20} et une bande d'absorption à 1 600 cm^{-1} qui est la caractéristique de la fonction Δ_4 3-CO.

Le spectre infra-rouge de l'acétate du stéroïde X_1 présente des bandes d'absorption à 1 740 cm^{-1} et à 1 240 cm^{-1} qui sont caractéristiques des acétates de corticostéroïdes.

— *Réaction à l'hydroxylamine et formation du complexe ferrique ** :

On a fait réagir 20 μg du produit d'oxydation de la substance X_1 avec l'hydroxylamine en milieu sodique et avec CL_3Fe dans l'acide perchlorique. La réaction a été positive avec 10 μg (maximum d'absorption 510 $m\mu$).

— *Evaluation quantitative :*

Deux évaluations quantitatives ont été faites en appliquant la formule de la page 40 et donnant les valeurs hypothétiques de :

(ϵ) : coefficient d'extinction moléculaire = 15.800 ;

P.M. : poids moléculaire = 350.

Avec cette formule, nous avons obtenu 120-150 μg par litre d'urine du composé X_1 après administration d'ACTH.

(*) Cette réaction a été réalisée avec M. J.-C. LEGRAND.

TABLEAU LVI

R, des produits d'oxydation par l'oxyde de chrome (CrO_3) du stéroïde X_1 , de l'aldostérone, de la 18-hydroxy 11-déhydrocorticostérone, de la 18-hydroxyprogesterone et de la 18-hydroxycortexone

STEROÏDE	PRODUIT D'OXYDATION (IO_4H)	SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES	
		Hexane-benzène (1-1)/ propanediol $R_{\text{adrenostérone}}$	Isooctane/méthanol- eau (5/3-2) $R_{\text{adrenostérone}}$
Adrénostérone/ (androsta 4-ène 3,11,17-trione)	Adrénostérone	1	1
Aldostérone	Lactone 20→18 de l'acide 11 β -hydroxy 3-one 18-oxo Δ_4 étiocholénique	0.84	0.23
18-hydroxy 11- déhydrocorticostérone	Lactone 20→18 de l'acide 18-hydroxy 3,11-dione Δ_4 étiocholénique	0.55	0.10
Composé X_1	Composé X_1 oxydé	1.14	3.00
18 hydroxy-cortexone	Lactone 20→18 de l'acide 18-hydroxy 3-one Δ_4 étiocholénique	1.10	1.10
Androstendione (androsta 4-ène 3,17-dione)	Androstendione	1.64	4.25

9) Action biologique

A une époque où nous n'avions pas isolé le stéroïde X_1 dans un état de pureté parfaite, le Docteur DESAULLES a mesuré le pouvoir de rétention du sodium et d'excrétion du potassium de cette substance sur le rat surrénalectomisé. Aux doses administrées (0,01-0,10 μ g), le stéroïde X_1 n'a eu aucune action sur le rapport Na/K dans les urines.

DISCUSSION

Il existe des analogies entre le stéroïde X_1 et l'aldostérone :

1° Le stéroïde X_1 présente un groupement Δ_4 3-CO, comme cela est prouvé par l'absorption dans l'ultraviolet en milieu éthanolique (maximum d'absorption à 238-240 $m\mu$; $E_{1\%}^{1\text{ cm}}$ et fluorescence jaune en milieu sodique en lumière de WOOD. Il ne donne pas la réaction de PORTER et SILBER, mais il est formaldéhydogène après oxydation periodique.

2° La vitesse de migration est identique à celle de l'aldostérone dans les systèmes chloroforme/formamide, toluène-acétate d'éthyle/méthanol-eau (9-1/5-5) et benzène/méthanol-eau (2/1-1).

3° Après oxydation par le periodate, bismuthate ou l'acide chromique, le dérivé d'oxydation possède une polarité plus faible que les substances d'origine, ce qui laisse supposer la formation d'une lactone à partir de l'étioacide formé, comme dans le cas de l'aldostérone et d'une façon plus générale des 18-oxo ou des 18-hydroxy 17-désoy-corticostéroïdes. Au contraire, les stéroïdes ne possédant pas d'hydroxyle en C_{18} , ce qui est le cas de la corticostérone, de la 11-déhydro-corticostérone, de la cortexone et de leurs métabolites hydrogénés, donnent des produits d'oxydation qui sont plus polaires que les stéroïdes dont ils dérivent.

La comparaison plus poussée de l'aldostérone et du stéroïde X_1 fait apparaître les différences suivantes :

1° Le R_f du stéroïde X_1 dans les systèmes isooctane/méthanol tertiaire-eau (10/5-9) et dans le système toluène/propanediol est différent de celui de l'aldostérone.

2° Le R_f de l'acétate du stéroïde X_1 est différent de celui du 18, 21-diacétate d'aldostérone.

3° Les produits d'oxydation du stéroïde X_1 par l'action de l'acide periodique, du bismuthate de sodium et de l'acide chromique sont

moins polaires que le produit d'oxydation correspondant de l'aldostérone dans le système hexane-benzène (1-1)/propanediol.

4° Le stéroïde X_1 ne réduit le bleu de tétrazolium que très lentement, contrairement à l'aldostérone.

Après oxydation chromique, bismuthique ou périodique, le produit d'oxydation est moins polaire que le stéroïde X_1 , il est extractible par l'éther de pétrole, cela nous a suggéré qu'il s'agissait probablement d'une lactone. En effet, le stéroïde X_1 ne possède pas d'hydroxyle en C_{17} ; il ne se transforme pas en un 17-cétostéroïde donnant une réaction de ZIMMERMANN positive et étant moins polaire que le stéroïde d'origine.

La preuve de l'existence de la formation d'une lactone repose sur l'obtention d'un acide hydroxamique par action de l'hydroxylamine qui donne une coloration rose violacé très sensible avec le Cl_3Fe (maximum d'absorption 510 $m\mu$).

Nous avons supposé que la structure de ce stéroïde présente des analogies avec celle de la 18-hydroxy-déoxycorticostérone. En effet, le produit d'oxydation de la 18-hydroxy-déoxycorticostérone comme celui de la 18-hydroxy-progestérone a une polarité très voisine du produit d'oxydation de la substance X_1 , dans le système hexane-benzène (1-1)/propanediol.

Cette hypothèse n'a pas pu être retenue, car dans le système iso-octane/méthanol-eau (5/3-2) le dérivé d'oxydation du stéroïde X_1 est moins polaire que la lactone obtenue à partir de ces deux stéroïdes de référence.

En outre, le stéroïde X_1 est plus polaire que la 18-hydroxy-déoxycorticostérone et sa polarité est voisine de celle de la 18-hydroxy 11-déhydrocorticostérone dans plusieurs systèmes chromatographiques. Là encore, le comportement du dérivé d'oxydation du stéroïde X_1 et du dérivé d'oxydation de la 18-hydroxy 11-déhydrocorticostérone sont très différents, cette dernière lactone est un peu plus polaire.

On peut écarter l'analogie de migration chromatographique avec le prégnà 4-ène 17 α , 20 β , 21-triol 3-one parce que le produit obtenu par oxydation : l'androsta 4-ène 3, 17-dione donne la réaction de ZIMMERMANN et ne donne pas la réaction du complexe hydroxylamine- Cl_3Fe , et ce 17-cétostéroïde est moins polaire que le produit d'oxydation du stéroïde X_1 dans le système iso-octane/méthanol-eau (5/3-2).

Si nous résumons les différents résultats positifs que nous avons obtenus avec ce stéroïde inconnu, nous pouvons conclure :

1° Il possède une fonction Δ_4 3-CO.

2° Il a une chaîne glycol ou α -cétol formaldéhydogène.

3° Il n'a pas d'hydroxyle en C_{17} puisqu'il ne donne pas la réaction de PORTER et SILBER, et il ne donne pas naissance à un 17-céto-stéroïde après oxydation.

4° Il donne naissance après oxydation à une lactone.

5° Il donne la réaction au bleu de tétrazolium qui se développe très lentement.

L'acétate du stéroïde X_1 donne naissance à un acétate qui est plus polaire que le diacétate de l'aldostérone.

PERON, qui a récemment isolé de la corticosurrénale de rat la 18-hydroxycorticostérone [5], a constaté aussi, en accord avec les travaux de PAPPO [6], que ce stéroïde donne naissance par action de la pyridine-anhydride acétique à un mono-acétate en C_{21} . Probablement l'hydroxyle hémiacétalique en C_{20} ($C_{18} \rightarrow C_{20}$) [7, 8] ne serait pas acétylable, le même phénomène pourrait s'expliquer dans le cas du stéroïde X_1 , qui aura un seul hydroxyle acétylable, s'il contenait d'autres hydroxyles acétylables, l'acétate formé serait nettement moins polaire. De même, la polarité relativement élevée du stéroïde X_1 dans les différents systèmes chromatographiques pourrait s'expliquer par interaction d'un hydroxyle en C_{12} , C_{14} ou C_{15} , avec le carbonyl en C_{20} et la formation d'un hydroxyle hémiacétalique.

Comme la lactone qui dérive du stéroïde X_1 est moins polaire que les lactones qui dérivent de l'aldostérone et de la 18-hydroxy 11-déhydrocorticostérone, on a pu supposer que le stéroïde X_1 ne possède pas plus de 4 oxygènes, sa lactone est également moins polaire que celle qui dérive de la 18-hydroxycortexone. Cela nous laisse donc supposer que l'hydroxyle qui se lactonise avec l'étioacide qui en dérive, se trouve en autre position qu'en C_{18} . Pour vérifier cette hypothèse, il est donc nécessaire de comparer le stéroïde X_1 avec le dérivé mono-hydroxyle en C_{12} , C_{14} ou C_{15} de la cortexone.

Le stéroïde X_1 que nous avons isolé présente des analogies avec le composé III de NOWACZYNSKI et coll. [10, 11] qui est obtenu après avoir soumis les conjugués des urines à pH 1, qui libère l'aldostérone et à une hydrolyse par la β -glucuronidase. Ce « composé III » présente des analogies indiscutables avec le stéroïde X_1 , dans le système chloroforme/formamide, toluène-acétate d'éthyle/méthanol-eau (9-1/5-5) et isooctane/butanol tertiaire-eau (10/5-5). Cependant le stéroïde X_1 est nettement plus polaire que le composé III dans le système toluène/propanediol. Ces auteurs estiment que le composé III ne réduit plus le bleu de tétrazolium ; par contre, le stéroïde X_1 a le même pouvoir de réduction du bleu de tétrazolium avant comme après passage sur colonne de gel de silice.

D'autres auteurs ont trouvé dans l'urine après hydrolyse par la β -glucuronidase, des substances semblables au stéroïde X_1 (COURCY et coll. [12], HOLNESS et GRAY [13], ZEELST [14] et CSORDAS et coll. [15], et BIRMINGHAM et WARD dans la surrénale de rat [16]).

CONCLUSION

Nous avons isolé des urines des sujets ayant reçu de l'ACTH un Δ_4 3-CO stéroïde, formaldéhydogène mais non 17-cétogénique.

Ce stéroïde donne naissance par oxydation à une lactone de faible polarité, il a été comparé à plusieurs 18-hydroxy-corticostéroïdes avant et après oxydation, mais il s'est avéré différent de tous les stéroïdes de référence avec lesquels nous l'avons comparé : aldostérone, 18-hydroxy 11-déhydrocorticostérone, 18-hydroxy-progesterone et 18-hydroxy-cortexone.

Nous émettons l'hypothèse qu'il s'agit d'un hydroxy-cortexone possédant un hydroxyle en position C_{12} , C_{14} ou C_{15} .

* *

BIBLIOGRAPHIE

1. NEHER (R.) et WETTSTEIN (A.). — *J. Clin. Invest.*, 1956, **35**, 800.
2. PASQUALINI (J.R.). — *Comptes Rendus Acad. Sci.*, 1958, **247**, 1061.
3. LUETSCHER (J.A., Jr.) et AXELRAD (B.J.). — *J. Clin. Endocrinol. and Met.*, 1954, **14**, 1086.
4. VENNING (E.H.) et DYRENFURTH (J.). — *J. Clin. Endocrinol. and Met.*, 1954, **14**, 783.
5. PERON (F.G.). — *Endocrinology*, 1961, **69**, 39.
6. PAPPO (R.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1959, **81**, 1010.
7. SCHMIDLIN (J.) et WETTSTEIN (A.). — *Helv. Chim. Acta*, 1960, **43**, 973.
8. SCHMIDLIN (J.) et WETTSTEIN (A.). — *Helv. Chim. Acta*, 1959, **42**, 2636.
9. NEHER (R.) et WETTSTEIN (A.). — *Helv. Chim. Acta*, 1960, **43**, 1171.
10. NOWACZYNSKI (W.J.), STEYERMARK (P.R.), KOIW (E.), GENEST (J.) et JONES (R.N.). — *Can. J. Biochem. and Phys.*, 1956, **34**, 1023.

11. NOWACZYNSKI (W.J.), KOIW (E.) et GENEST (J.). — *Canad. J. Biochem. and Phys.*, 1957, **35**, 425.
 12. COURCY (C. DE), BUSH (I.E.), GRAY (C.H.) et LUNNON (J.B.). — *J. Endocrinol.*, 1953, **9**, 401.
 13. HOLNESS (N.J.) et GRAY (C.H.). — *J. Endocrinol.*, 1958, **17**, 237.
 14. ZEELST (A.M.C. VAN), SCHWARZ (F.) et FAST (A.K.). — *Lancet*, 1957, **2**, 896.
 15. CSORDAS (J.), JOBST (P.) et CHOLNOKY (P.). — *Lancet*, 1960, 7118, 290.
 16. BIRMINGHAM (M.K.) et WARD (P.J.). — *J. Biol. Chem.*, 1961, **236**, 1661.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I. — Métabolisme intermédiaire des hormones corticosurrénales . .	6
— <i>Métabolisme intermédiaire des hormones corticosurrénales</i>	6
— <i>Métabolisme intermédiaire du cortisol</i>	8
— <i>Métabolisme intermédiaire de la corticostérone</i>	13
— <i>Métabolisme intermédiaire de la 17α-hydroxycortexone</i>	15
— <i>Métabolisme intermédiaire de la cortexone (DOC)</i>	17
— <i>Métabolisme de l'aldostérone</i>	17
— <i>Modes de conjugaison des corticostéroïdes urinaires</i>	18
— <i>Bibliographie</i>	20
CHAPITRE II. — Techniques	24
— <i>Extraction et fractionnement des corticostéroïdes conjugués</i>	24
— <i>Purification des glucosiduronates de corticostéroïdes par chromatographie de partage sur colonne de célite</i>	27
— <i>Hydrolyse et solvolysé des corticostéroïdes conjugués</i>	27
— <i>Purification des corticostéroïdes libres</i>	28
— <i>Chromatographie sur papier</i>	29
— <i>Méthodes de purification des corticostéroïdes libres et de leurs acétates après élution du chromatogramme</i>	32
— <i>Microméthodes d'identification des corticostéroïdes</i>	35
— <i>Microméthodes d'analyse quantitative des corticostéroïdes</i>	37
— <i>Spectrophotométrie des corticostéroïdes</i>	39
— <i>Bibliographie</i>	41
CHAPITRE III. — Répartition des corticostéroïdes urinaires entre les fractions libre, ester-sulfate et glucosiduronate, après administration d'ACTH	43
— <i>Matériel et méthodes</i>	43
— <i>Identification des différents corticostéroïdes</i>	47
— <i>Evaluation quantitative des différents stéroïdes</i>	64
— <i>Discussion des résultats</i>	64
— <i>Conclusion</i>	67
— <i>Bibliographie</i>	68

CHAPITRE IV	70
I. Identification du sulfate de corticostérone et du sulfate de cortisol dans l'urine humaine	70
— <i>Synthèse des 21-sulfates de corticostéroïdes</i>	71
— <i>Séparation chromatographique sur papier des six 21-sulfates de corticostéroïdes</i>	78
— <i>Modes de détection des ester-sulfates sur le chromatogramme</i>	80
— <i>Identification du sulfate de corticostérone dans l'urine humaine</i>	81
— <i>Identification du sulfate de cortisol dans l'urine humaine</i>	84
II. Identification du 3, 21-disulfate de prégn-5-ène 3 β , 21-diol 20-one dans l'urine humaine	88
III. Identification du glucosiduronate de 5 β -prégnane 3 α , 21-diol 20 one dans l'urine humaine	103
Chromatographie d'adsorption sur papier des acétates de stéroïdes	108
— <i>Bibliographie</i>	114
CHAPITRE V. — Isolement dans l'urine humaine d'un Δ_4 3-CO stéroïde donnant naissance à une lactone par oxydation	115
— <i>Discussion</i>	123
— <i>Conclusion</i>	126
— <i>Bibliographie</i>	126

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

**Transformations chimiques
par des micro-organismes sur les stéroïdes**

Etude chimique et stéréochimique

Vu et approuvé :

Paris, le 2 février 1962

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

MARC ZAMANSKY

Vu et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN ROCHE

